

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LA PRÉMUNITION DES NOUVEAU-NÉS PAR LE BCG

par le Dr B. IAKHNIS.

(*Documents de la Commission ukrainienne.*)

La vaccination des nouveau-nés d'après Calmette fut commencée à Kharkoff vers le milieu de septembre 1925. Dix-neuf mois se sont écoulés depuis. Nous croyons donc possible de faire part de nos impressions qui ont au moins un intérêt statistique et qui contribuent à l'étude de l'un des plus importants problèmes des temps présents.

Nous croyons aussi que cette publication est nécessaire parce que nos documents sont jusqu'à présent uniques en U. R. S. S. et peuvent donner quelques indications à d'autres travailleurs dans le même domaine.

La vaccination des enfants nouveau-nés ne fut sanctionnée par la Commission ukrainienne du BCG qu'après que celle-ci eut été convaincue par l'expérimentation, faite sur une large échelle, que les divers animaux résistent aux doses massives du BCG introduites par les voies les plus différentes [*per os, sous-cutanée, intrapéritonéale, intraveineuse, et intracardiaque*] (1).

(1) TZEKHNOWITZER. Ces *Annales*, n° 3, 1926.

La première expérience de vaccination décidée par la Commission fut effectuée, d'accord avec le Pr agrégé Tzehnowitzer, dans trois maternités de la ville de Kharkoff, en septembre et octobre de l'année 1925. Pendant cette période, avec le consentement des parents, à peu près 300 enfants ont été vaccinés, sans tenir compte exclusivement des contacts tuberculeux dans les familles. Ultérieurement (d'après la résolution de la 10^e Réunion des bactériologistes de l'U. R. S. S.) on vaccina de préférence les enfants qui étaient obligés de vivre constamment dans un milieu bacillifère (formes ouvertes ou actives de la tuberculose des poumons).

L'organisation du travail relatif à la vaccination des nouveau-nés fut réglée ainsi qu'il suit :

Les femmes enceintes tuberculeuses, ou bien vivant dans des foyers tuberculeux, étaient signalées d'avance par les dispensaires qui en informaient le Service d'enfants de l'Institut pour les tuberculeux de Kharkoff.

La même sélection se faisait dans les consultations de la « Défense de la Maternité ». Malheureusement les dispensaires, ainsi que les consultations, n'ont pas suffisamment apprécié la gravité du problème qui leur avait été proposé, et beaucoup de femmes enceintes ont été signalées seulement dans les maternités par les médecins pédiatres, chefs des Services de maladies des nouveau-nés, ou bien elles échappèrent complètement à notre action lors de leur accouchement.

Nous nous rendions parfaitement compte des déficiences de cette organisation et toutes les mesures nécessaires furent prises pour les écarter.

Il en est résulté que nous n'avons qu'un nombre restreint d'enfants prémunis, mais nous avons l'avantage d'avoir pu garder en observation un nombre appréciable d'enfants de familles tuberculeuses, non prémunis, élevés dans des conditions d'existence presque identiques, surveillés en même temps que les prémunis, et qui nous seront très utiles pour les comparaisons et pour le contrôle des effets de la vaccination par le BCG.

472 enfants ont été vaccinés du 15 novembre 1925 au 15 avril 1927.

De ce nombre ont échappé à notre observation . . .	42 enfants.
Sont morts de diverses maladies	26 enfants.
Sont restés en observation	404 enfants.
Total	472 enfants.

Les 42 enfants qui ont échappé à notre observation provenaient de familles qui avaient quitté la ville de Kharkoff et qui, malgré leurs promesses, ne nous ont envoyé aucune nouvelle jusqu'à présent. Quelques-uns de ces enfants appartenaient à des mères qui avaient accouché sous des noms d'emprunt et avaient indiqué de fausses adresses lors de la première vaccination. Quoique le pourcentage de ces enfants (9 p. 100) soit relativement faible et très inférieur aux chiffres des auteurs français, nous nous efforçons toujours de l'abaisser davantage.

Pour ce qui est des observations relatives aux enfants pré-munis, nous les classerons dans le tableau ci-après d'après l'âge et la nature du contact tuberculeux dans la famille.

TABLEAU I. — Classification des enfants prémunis d'après l'âge et la nature du contact tuberculeux.

CONTACT	ÂGE			TOTALS
	12-19 mois	6-12 mois	0-6 mois	
Pas de contact connu . . .	152	4	3	156 (38,6 p. 100)
Contact avec tuberculeux suspects	61	23	28	112 (27,7 p. 100)
Avec formes actives de tuberculose	49	43	33	95 (23,5 p. 100)
Avec formes ouvertes, continues ou intermittentes, de TBC	15	11	15	41 (10,2 p. 100)
Totaux	277	48	79	404
	68,5 p. 100	11,9 p. 100	19,6 p. 100	

Ce tableau montre que plus des 2/3 des enfants sont suivis depuis plus d'une année et que la majorité, dans ce groupe, a dépassé l'âge d'un an et demi.

Relativement à la nature des contacts, nous devons indiquer que le terme « formes ouvertes, continues ou intermittentes » est appliqué aux malades qui n'expectorent des bacilles que par intermittence ou qui cessent d'en expectorer à la suite de pneumothorax artificiel, bien qu'ils continuent à tousser.

Ces malades, signalés par nos dispensaires comme tuberculeux ouverts, par rapport à tous les bacillifères, formaient près de 15 p. 100 et nous avons résolu de les noter spécialement pour donner une qualification plus déterminée du contact dans lequel vivent les enfants vaccinés.

Le groupe « tuberculeux suspects » est mis à part pour les deux raisons suivantes : 1^o une partie de ces malades n'a pas encore été diagnostiquée définitivement, pour telle ou telle cause, par les dispensaires, ou bien, ayant été nettement signalés, ils n'ont pas encore fréquenté le dispensaire ; 2^o (ce qui a surtout de l'importance pour le but que nous poursuivons) nous avons voulu séparer un groupe d'enfants qui, au moins dans leur entourage familial, n'évoquent, au point de vue de la possibilité du contact tuberculeux, absolument aucune suspicion.

CONDITIONS SOCIALES DE L'EXISTENCE DES ENFANTS PRÉMUNIS.

Pour juger du développement des enfants vaccinés par le BCG, les conditions sociales dans lesquelles ils se trouvent dès les premiers jours de leur vie sont de très grande importance. Sur ce point, nous nous bornons jusqu'à présent à étudier trois éléments fondamentaux : l'habitation, l'aisance matérielle et les soins (tableau II).

TABLEAU II. — **Habitation, conditions matérielles et soins.**

<i>Conditions du logis :</i>		
Bonnes	2 p. 100	
Satisfaisantes	40	—
Mauvaises	50	—
Très mauvaises	8	—
<i>Conditions matérielles :</i>		
Bonnes	2 p. 100	
Satisfaisantes	58	—
Mauvaises	40	—
<i>Soins :</i>		
Bons	10 p. 100	
Satisfaisants	60	—
Mauvais	30	—

La grave crise du logement traversée par la population de la ville de Kharkoff nous force à beaucoup de réserves sur la

qualification des logis; de sorte que, dans la rubrique « logis satisfaisants », sont partiellement enregistrés des logis qui, en réalité, ne correspondent guère à cette qualification. En général, nous pouvons dire que les familles de nos enfants appartiennent aux classes moyennes et pauvres de la population, qui ne peuvent pas fournir au nourrisson les conditions de milieu, l'entourage et les soins susceptibles d'assurer sa croissance absolument normale. Si nous ajoutons à cela qu'un pourcentage considérable de ces enfants était soumis à l'allaitement mixte dès les premiers mois de leur existence, tandis qu'une autre partie était élevée au moyen de l'allaitement purement artificiel, nous devons convenir que les enfants prémunis ne diffèrent en rien des clients habituels de nos consultations en ce qui concerne les conditions sociales, et il se peut même qu'ils soient, à cet égard, au-dessous du niveau moyen.

De temps en temps, dans différentes Commissions où l'on discuta l'emploi de la vaccination d'après Calmette, on s'est inquiété de savoir s'il était réellement possible de comparer la morbidité et la mortalité des enfants prémunis à celle des non-prémunis, pour cette double raison que peut-être les enfants prémunis sont plus soigneusement suivis, et que l'application des mesures prophylactiques se fait plus énergiquement dans les foyers tuberculeux.

Nous devons dire qu'à Kharkoff ces conditions artificielles particulières n'existent pas pour les enfants prémunis. Ils sont suivis dans les consultations en même temps que les non-prémunis, et il arrive seulement quelquefois qu'ils soient convoqués supplémentairement pour les soumettre aux réactions tuberculiniques.

Tout ceci s'applique aussi bien au grand nombre d'autres enfants, et plus rigoureusement *aux enfants non prémunis des foyers tuberculeux*; les uns et les autres sont également éduqués par les dispensaires au point de vue sanitaire et prophylactique.

Nous ne pouvons noter aucun cas où nous ayons réussi à préserver nos enfants prémunis d'une infection massive plus complètement que cela se produit d'habitude. Nous ne voulons pas dire par là que les enfants prémunis ne demandent guère de mesures sanitaires dirigées en vue d'empêcher la surinfection fréquente. Nous ne faisons que constater l'existence de cet

état de choses et l'impossibilité de le modifier, en raison des conditions d'une grande crise domiciliaire et du manque d'institutions propres à l'isolement des nourrissons de familles bacillifères.

DÉVELOPPEMENT DES ENFANTS PRÉMUNIS.

Après une courte étude des conditions sociales de l'existence des enfants prémunis, passons à l'analyse de l'influence de la vaccination sur leur développement.

La vaccination s'effectuait, comme règle, dans les trois maternités, les troisième, cinquième et septième jours de l'existence du nouveau-né, par l'absorption *per os*, une demi-heure avant la tétée, de 0,01 du BCG préparé par l'Institut Sanitaire et Bactériologique de la ville de Kharkoff. Chaque nourrisson recevait en tout 0 gr. 03 de vaccin, soit 1.200.000.000 de bacilles. Pendant tout le temps de la surveillance nous n'avons jamais pu constater la moindre influence fâcheuse de la vaccination sur l'état intestinal du nourrisson, même dans les cas, rares il est vrai, où il s'agissait de prématurés de sept mois, et de quelques cas, non diagnostiqués au premier abord, de syphilis ou de malformation cardiaque.

En ce qui concerne le développement ultérieur de ces enfants nous n'avons pas davantage pu constater quoi que ce soit d'anormal qu'on pût être porté à attribuer à la vaccination. Au moment du dernier examen (le 15 avril 1927) le développement des enfants se présentait comme suit (Tableau III) :

TABLEAU III. — Développement des enfants prémunis.

AGE	DÉVELOPPEMENT normal	DYSTROPHIE insignifiante	DYSTROPHIE prononcée	PORTEURS d'adenopathie trachéo-bronchique	TOTAUX
12-19 mois	251	17	4	5	277
6-12 mois	44	12	12	—	48
0-6 mois	77	2	—	—	79
Totaux	372	21	6	5	404
	92,4 p. 100	5,2 p. 100	1,5 p. 100	1,2 p. 100	

Ce tableau appelle quelques explications complémentaires : Nous rapportons au groupe des enfants développés « normalement » ceux qui ont un accroissement pondéral régulier, le tonus musculaire et le turgor suffisants, et qui ne présentent pas d'anomalies de constitution prononcées qui soient susceptibles d'influencer leur développement.

Dans la rubrique « Porteurs d'adénopathie trachéo-bronchique », nous comptons les enfants qui, donnant une réaction tuberculinique positive indubitable, ont, soit des symptômes évidents d'adénopathie trachéo-bronchique (stridor, dyspnée expiratoire, toux bitonale, bronchite à répétition, Röntgen positif), soit des phénomènes généraux qui ne peuvent être expliqués que par la présence de tuberculose occulte localisée, comme il est, croyons-nous, de règle dans les ganglions intrathoraciques.

Les *dystrophiques* plus ou moins accusés furent comptés comme tels seulement dans les cas où ils fournissaient une intradermo-réaction négative et où nous constations toute une série de conditions pouvant expliquer le développement quelque peu anormal de l'enfant (logis malsain, sans lumière solaire, insuffisance complète d'air pur, alimentation irrégulière et désordonnée, allaitement artificiel trop précoce, graves infections aiguës supportées, prématurés). En cela nous avons voulu distinguer la dystrophie proprement dite de celle qui est provoquée par l'existence d'un foyer tuberculeux occulte.

* * *

Si maintenant, tenant compte des indications données ci-dessus, nous analysons le tableau III, nous voyons que le plus grand nombre des enfants prémunis se développent tout à fait normalement ; 8 p. 100 seulement sont retardés à des degrés variables dans leur croissance, ou présentent des poids quelque peu inférieurs à ceux relevés dans les consultations de Khar-koff (10-12 p. 100).

Le groupe des porteurs de signes d'adénopathie trachéo-bronchique présente incontestablement un intérêt particulier, car il atteste bien que leur pourcentage est très faible ; que les enfants prémunis contractent l'infection bacillaire, et il s'agit de savoir (c'est ce que nous examinerons plus loin)

comment ils réagissent à cette infection, comparativement avec les enfants non prémunis.

Mais voyons d'abord comment s'effectue la croissance et quelle est la morbidité des enfants en contact tuberculeux (Tableau IV).

TABLEAU IV. — Développement des enfants en relation avec le contact.

AGE	DÉVELOPPEMENT normal	DYSTROPHIE insignifiante	DYSTROPHIE prononcée	PORTEURS d'adénopathie trachéobronchique	TOTAUX
A. — Absence du contact familial.					
12-19 mois	143	6	2	1	152
6-12 mois	4	—	—	—	1
0-6 mois	3	—	—	—	3
Totaux	147 94 p. 100	6 4 p. 100	2 1,3 p. 100	1 7 p. 100	156
B. — Familles ayant des malades suspects de tuberculose.					
12-19 mois	55	5	1	—	61
6-12 mois	20	2	1	—	23
0-6 mois	27	1	—	—	28
Totaux	102 91 p. 100	8 7 p. 100	2 2 p. 100	—	112
C. — Familles gravement atteintes de tuberculose évolutive.					
12-19 mois	41	4	1	3	49
6-12 mois	13	—	—	—	13
0-6 mois	32	1	—	—	33
Totaux	86 90 p. 100	5 5,5 p. 100	1 1 p. 100	3 3,5 p. 100	95
D. — Familles atteintes de formes ouvertes de T., ou bacillifères intermittents.					
12-19 mois	12	2	—	1	15
6-12 mois	10	—	1	—	11
0-6 mois	13	2	—	—	15
Totaux	35 85 p. 100	4 10 p. 100	1 2,5 p. 100	1 2,5 p. 100	41

Quelle conclusion pouvons-nous tirer de l'examen attentif du tableau IV en ce qui concerne l'influence de la prémunition sur le développement des enfants en contact tuberculeux?

Il est établi qu'aucune différence sensible ne se manifeste entre les groupes A B C D. Dans le groupe C, le fait que quelques enfants présentent de l'adénopathie trachéo-bronchique doit retenir notre attention.

Le cas de dystrophie très prononcée noté dans ce tableau se rapporte à un prématûré de sept mois, ayant un poids de 1.300 grammes à la naissance, soumis à l'allaitement artificiel de très bonne heure à cause de manque de lait chez la mère qui portait un pneumothorax artificiel. L'enfant présenta une réaction tuberculinique négative et les conditions indiquées ci-dessus nous donnent le droit de ne pas le considérer, provisoirement du moins, comme tuberculeux.

Nos observations, poursuivies pendant un an et demi, nous permettent donc de nous rallier à l'opinion du professeur Calmette et de ses collaborateurs et d'affirmer que la vaccination des nouveau-nés par le BCG n'exerce aucune influence nuisible sur le développement ultérieur des enfants.

MORTALITÉ DES ENFANTS PRÉMUNIS.

Sur l'ensemble des enfants prémunis, jusqu'au moment du dernier relevé du 15 avril 1927, 26 étaient décédés. On peut les classer ainsi d'après l'âge :

Morts à l'âge de trois mois	4
Morts à l'âge de trois à six mois	6
Morts à l'âge de six à douze mois	12
Morts à l'âge de douze à dix-huit mois	4

Les causes des décès sont indiquées dans le tableau V.

Les causes des décès furent déterminées presque exclusivement par le processus clinique de la maladie.

Les autopsies n'ont pas pu être effectuées parce que les enfants mouraient dans leurs familles. Le plus grand nombre des décès porte sur les affections aiguës des voies respiratoires et intestinales qui, de l'avis unanime des pédiatres, occasionnent normalement la mortalité des enfants du premier âge. Les doutes qu'on peut émettre du fait de l'absence d'autopsie ou sur l'exactitude des diagnostics, et par suite sur la possibilité de mettre une partie de ces décès au compte de la tuberculose, nous semblent peu fondés pour les raisons suivantes : toute la

mortalité, — par hasard sans doute, — tombe sur les familles où le contact tuberculeux n'existe pas ou presque pas. Cette circonstance, de même que le très faible pourcentage de la mortalité générale des enfants prémunis (6 p. 100), — presque deux fois inférieur à la moyenne relevée à Kharkoff pour cet âge, — nous démontre que la détermination des causes des décès que nous venons de donner correspond à l'état réel des choses.

TABLEAU V. — Causes des décès des enfants prémunis.

CAUSE DES DÉCÈS	ABSENCE de contact	TUBERCULUX suspects	TBC active	FORMES ouvertes de TBC	TOTAL
Pneumonie grippale	6	1	—	—	7
Troubles aigus intestinaux	5	5	—	—	10
Infection septique	2	—	—	—	2
Scarlatine	2	—	—	—	2
Rougeole	1	—	—	—	1
Coqueluche	1	—	—	—	1
Méningite cérébro-spinale	1	—	—	—	1
Tuberculose pulmonaire (1)	—	—	—	4	4
Cause inconnue	1	—	—	—	1
Totaux	49	6	—	4	26

(1) L'enfant étant mort en dehors de Kharkoff nous manquons de renseignements précis sur la cause de son décès.

Jusqu'au 15 avril 1927, un seul enfant est mort de tuberculose, à l'âge de dix mois et demi. Ce cas demande à être examiné de près. L'enfant provenait d'une famille bacillifère où le père était atteint de phthisie caverneuse des deux poumons. Contact très intime dans des conditions domiciliaires et matérielles très mauvaises.

Jusqu'à six mois, le développement du nourrisson fut tout à fait satisfaisant. A partir du commencement du septième mois, le processus pulmonaire s'établit graduellement, et un peu plus de trois mois plus tard l'enfant succombait sans que, là aussi, l'autopsie eût pu être effectuée; mais l'observation clinique ne laisse aucun doute sur la véritable cause de ce décès. Nous l'avons considéré comme certainement dû à la tuberculose.

De sorte que, en dépit des déplorables conditions d'habitation

et d'existence déjà mentionnées, on voit que la mortalité générale des enfants prémunis ne dépasse pas les chiffres moyens habituels de cet âge. Si nous ajoutons que la plupart de ces enfants ont eu à subir les atteintes de la grippe et de la pneumonie, et que plusieurs d'entre eux ont souffert de la rougeole, de la coqueluche et de la scarlatine, la conclusion qui se dégage d'elle-même est que *la prémunition n'a exercé aucune influence nuisible sur la résistance générale des sujets.*

Après les publications du professeur Calmette (1) sur le BCG et sur les altérations anatomo-pathologiques qu'il est susceptible de produire lorsqu'il est introduit à doses massives dans les organes des animaux, toute une série d'expérimentateurs (2) se sont occupés de cette question et leurs opinions ont été parfois divergentes,

Les polémiques qui en sont résultées peuvent être considérées comme closes parce qu'il est maintenant évident pour tous que, lorsqu'on introduit des doses massives du BCG dans l'organisme d'un animal, on peut déterminer des altérations locales d'apparence tuberculeuse, mais d'un caractère nettement bénin et incapables d'être le point de départ du développement d'un processus tuberculeux évolutif. Ces lésions anatomo-pathologiques régressent régulièrement au bout d'un temps plus ou moins long, et il semble bien que l'immunité contre une infection bacillaire virulente ultérieure dépende de la pré-existence de ces foyers chez les animaux prémunis.

En conséquence, on peut penser que cette « tuberculogénie bénigne », produite par le BCG, devient la qualité essentielle à laquelle le vaccin de Calmette doit ses effets immunisants.

Comme l'a indiqué le professeur Calmette, les doses massives (jusqu'à 100 milligrammes) provoquent, chez le cobaye, au bout de quelques semaines, un gonflement passager de tous les ganglions lymphatiques, surtout des ganglions mésentériques. En même temps apparaissent, dans lesdits organes, des formations folliculaires contenant des bacilles acido-résistants. Mais les animaux restent parfaitement bien portants. Il paraît toutefois que cette réaction du système lymphatique ne

(1) CALMETTE. *Ces Annales*, no 2, 1926, no 7, 1926, no 3, 1927.

(2) LÖWENSTEIN. W. K. W., no 41, 1926; KRAUS. Z. f. *Immunitätsforschung*, 51, 34; GEHLACH. *Ibidem*.

s'obtiendrait pas chez les rongeurs prémunis *per os*, du moins avec la même constance, d'après les observations de l'Institut sanitaire bactériologique de Kharkoff [Tzehnowitzer (1)].

Etant donné l'extrême importance de cette question pour ce qui se rapporte aux enfants prémunis *per os*, nous avons institué des observations systématiques dans une institution de nourrissons pourvue d'un internat.

Une expérience de plusieurs années nous a démontré que les enfants trouvés, qu'on y apporte dès les premiers jours de leur existence, ne vivent pas et succombent ordinairement, après un délai plus ou moins prolongé, à des troubles gastro-intestinaux. Or, un nombre assez considérable de ces enfants fut soumis à la prémunition d'après Calmette. L'observation de ces enfants se poursuit et les documents anatomo-pathologiques dont nous disposons seront publiés plus tard.

Mais, dès à présent, nous pouvons dire que les autopsies des enfants prémunis dans cette institution et décédés entre dix jours et cinq mois après la vaccination, n'ont présenté aucune lésion ni altération macroscopique qu'on eût pu mettre au compte de l'absorption de BCG. Des recherches histologiques sont faites sur ces organes. Jusqu'à présent, elles n'ont donné aucun résultat positif. De telles autopsies ont pour nous une grande valeur. Leurs résultats démentent nettement les doutes de ceux qui se demandent encore si l'on est fondé à soumettre les enfants à la prémunition. Si les bacilles BCG contenus dans le système lymphatique de ces enfants, qui sont affaiblis, privés de toute résistance, et qui s'acheminent lentement mais sûrement vers la mort, n'ont manifesté, pendant un espace de temps assez long, aucune action pathogène, nous n'avons évidemment aucune raison de croire qu'il en puisse être autrement dans l'organisme des enfants placés dans des conditions normales de développement.

Il est naturel que ceux qui s'occupent de la vaccination des nouveau-nés par le BCG s'inquiètent de savoir si ce bacille acido-résistant est capable de subir, après un séjour plus ou moins long dans l'organisme de l'enfant, des mutations qui lui permettent de recouvrer ses qualités pathogènes primitives.

(1) TZEKHNOWITZER. Ces *Annales*, n° 3, 1927.

C'est une question tellement grise que nous devons tout faire pour essayer de la résoudre.

Le professeur Calmette s'y est attaché depuis longtemps et la discute dans tous ses écrits. Il a pris à son sujet une position très nette. Selon lui il sera peut-être possible, par quelque artifice de laboratoire, de restituer au BCG la virulence du bacille bovin initial qui a servi à le préparer, mais personne n'y est encore parvenu et le BCG n'a jamais récupéré de virulence, même par un très long séjour dans l'organisme animal ou humain.

Le laboratoire de l'Institut Sanitaire Bactériologique de l'Ukraine n'y est pas parvenu davantage au moyen de passages réitérés et successifs des organes des animaux et de la culture pure du BCG tirée de ces derniers.

D'autre part, nous avons des résultats d'observations qui durent depuis cinq ans sur des enfants prémunis et dont plusieurs ont été revaccinés. Or, jusqu'à présent, ces enfants sont cliniquement tout à fait bien portants. Il nous semble qu'il n'y a aucune raison d'avoir des craintes à leur sujet pour l'avenir. On peut donc actuellement considérer comme établi que, vis-à-vis de la tuberculose, l'immunité peut être le plus sûrement réalisée par l'introduction dans l'organisme d'un virus tuberculeux *vivant*, mais il est essentiel que l'infection ainsi provoquée soit peu massive et faiblement virulente : alors l'organisme, en règle générale, en vient facilement à bout et acquiert l'aptitude biologique à écarter ou à subir, sans en être incommodé, les infections exogènes subséquentes.

ACTION IMMUNISANTE DE LA SOUCHE BCG.

Si l'innocuité pratique de la prémunition des nouveau-nés d'après Calmette ne fait plus, pour nous, maintenant aucun doute, il n'est pas encore possible d'être fixé sur la durée de l'immunité qu'elle détermine. Cependant, nous croyons de quelque intérêt de faire connaître nos impressions actuelles et les notions d'orientation qu'elles suggèrent.

Examinons d'abord les résultats des réactions tuberculiniques chez les enfants prémunis. Cette question intéressante possède déjà sa petite histoire.

Récemment, le professeur Calmette a proposé de s'abstenir d'employer la tuberculine chez les enfants prémunis, et cela pour deux motifs : 1^o parce que les résultats de la réaction peuvent être également positifs pour les sujets imprégnés de BCG et pour ceux spontanément infectés avec des bacilles virulents provenant de leur entourage. Ces réactions ne peuvent donc rien nous apprendre sur l'origine vaccinale ou naturelle de l'infection ; 2^o parce que, et cette raison est la plus grave, l'introduction de la tuberculine dans l'organisme des animaux prémunis par le BCG peut les sensibiliser vis-à-vis de l'infection virulente naturelle, ce qui présente un certain danger.

Au début de nos expériences, nous avions un autre point de vue, et nos observations ultérieures prouvent que nous étions dans la vérité. Plusieurs centaines de réactions tuberculiniques intra-cutanées, faites aux enfants prémunis (vivant dans les milieux tuberculeux ou indemnes), prouvent leur innocuité complète.

L'expérimentation largement effectuée sur les cobayes par Tzehnowitzer et Goldenberg (1), dans le but d'activer le BCG par l'injection fréquemment répétée de doses massives de tuberculine, fournit aussi des résultats absolument négatifs.

Les pédiatres français [Weill-Hallé et Turpin (2)] qui travaillent en collaboration directe avec Calmette, emploient largement les réactions tuberculiniques chez les enfants prémunis qu'ils suivent, et ils n'ont jamais constaté qu'il en résulte des inconvenients.

Sans doute, il est important de suivre les effets de ces réactions sur le même enfant au moment de leur apparition et de leur disparition, surtout lorsqu'il s'agit d'enfants prémunis.

Malheureusement les conditions objectives du travail, et les résistances continues que l'on rencontre de la part des mères, ne nous ont pas permis d'étudier ce rapport mutuel sur une grande quantité d'enfants. Nous continuons à effectuer ces réactions tuberculiniques, mais nous ne pourrons en tirer des conclusions que dans un avenir plus ou moins éloigné. En attendant, on peut admettre les faits suivants :

Pendant les trois premiers mois de leur vie, les enfants pré-

(1) Les expériences ne sont pas encore publiées.

(2) WEILL-HALLÉ et TURPIN. Ces *Annales*, n° 3, 1927.

munis par le BCG, vivant sûrement à l'abri des contacts tuberculeux, réagissent à la tuberculine négativement. A partir du quatrième et cinquième mois, les réactions fournissent un pourcentage variable de résultats positifs. Elles peuvent varier dans leur intensité, et même partiellement disparaître au bout d'un laps de temps indéterminé, selon le sujet. Leur particularité caractéristique consiste, selon notre expérience, en une intensité moindre et en une évolution plus rapide, achevée en deux à trois jours. Ces observations ont quelque valeur parce qu'elles sont toujours faites par la même personne, avec une dilution de tuberculine au millième et avec une inoculation de contrôle au bouillon glycériné dilué au même titre.

Dans le tableau ci-après nous indiquons les résultats des réactions tuberculiniques pratiquées chez les enfants non en contact tuberculeux confirmé. On inoculait quelques enfants isolés plusieurs fois et tout résultat positif était marqué, même s'il ne l'était pas à toutes les réactions.

TABLEAU VI. — Résultats des réactions tuberculiniques.

AGE	TUBERCULEUX SUSPECTS			ABSENCE DE CONTACT		
	Nombre d'enfants	Résultats positifs	Positif p. 100	Nombre d'enfants	Résultats positifs	Positif p. 100
12-19 mois	94	35	38	39	21	54
6-12 mois	—	—	—	15	5	33
0-6 mois	—	—	—	9	1	10

L'âge des enfants a été précisé au moment du dernier relevé de toutes les données; les réactions tuberculiniques s'observaient à des moments différents; on obtenait le résultat positif habituellement jusqu'à l'âge d'un an.

Les données de ce tableau sont pour nous d'un grand intérêt surtout en comparaison avec les résultats des réactions tuberculiniques relevées sur les nourrissons *non prémunis* vivant dans un entourage *non tuberculeux*.

Avec la technique adoptée par nous, le pourcentage des enfants réagissant positivement atteint le maximum de 3-4. De sorte que, *chez les prémunis*, les réactions positives sont 10 fois plus fréquentes que chez les non-prémunis. Nous croyons

que ce pourcentage serait encore plus considérable, s'il était possible de pratiquer ces réactions tuberculiniques plus systématiquement. Ce fait n'a rien d'étonnant, si l'on veut bien se rappeler qu'on obtient des réactions tuberculiniques positives chez les animaux et chez les enfants inoculés même avec des bacilles morts. Nous attirons l'attention sur ce fait, surtout parce que certains expérimentateurs allemands ne trouvaient *a priori* aucun avantage dans la vaccination elle-même en raison de l'absence d'allergie tuberculeuse chez certains enfants prémunis par le BCG.

Sans prétendre résoudre le problème encore discutable des rapports mutuels entre la cuti-allergie et l'immunité contre la tuberculose, nous signalons simplement les faits que nous avons observés.

Les résultats sont un peu différents si nous examinons les réactions tuberculiniques pratiquées sur les enfants prémunis vivant dans un milieu évidemment tuberculeux, et surtout dans les familles bacillifères.

TABLEAU VII. — Résultats des réactions tuberculiniques.

ENFANTS PRÉMUNIS âge	CONTACTS avec tuberculose active			CONTACTS avec tuberculoses ouvertes		
	Nombre d'enfants	Réaction positive	Positif p. 100	Nombre d'enfants	Réaction positive	Positif p. 100
12-19 mois	29	16	55	12	8	66
6-12 mois	9	4	44	7	6	86
0-6 mois	12	1	8	4	3	75

Ici nous devons attirer l'attention sur le fait suivant : dans les deux derniers groupes (familles avec une tuberculose active et malades bacillifères) les réactions tuberculiniques, positives pour la plupart, sont normalement proéminentes, persistent longtemps et se répètent toujours lorsqu'on les renouvelle, contrairement à ce qu'on observe chez les enfants prémunis vivant au dehors des contacts tuberculeux évidents.

D'après notre longue expérience nous avons l'impression que les groupes d'enfants vivant dans un milieu tuberculeux donnent des réactions du même type que celui que nous sommes habitués à constater chez les enfants non prémunis

infectés de tuberculose. Cela est surtout évident pour ceux compris sous la rubrique : « formes ouvertes de la tuberculose » où 75 p. 100 des enfants donnent des réactions positives déjà avant l'âge de six mois. Malgré l'exiguïté des chiffres, cette particularité intéressante acquiert une grande valeur statistique. Autrement dit : les enfants des foyers tuberculeux, malgré la prémunition antérieure, sont infectés par le bacille dans leur milieu familial.

S'il en est ainsi (et nous ne trouvons pas d'autre explication aux différences observées dans les caractères de la réaction tuberculinique), nous pouvons essayer d'expliquer l'influence de la prémunition par le BCG sur l'infection précoce des nourrissons par la tuberculose, ainsi que sur leur résistance et leur vitalité.

Nos chiffres ne sont pas élevés, le délai d'observation n'est pas assez long : pourtant nous pouvons fournir dès à présent quelques données qui ne sont pas dépourvues d'intérêt.

Du tableau IV qui résume les observations relatives au développement des enfants prémunis, on peut conclure que même ceux des familles bacillitères se développent très normalement dans l'immense majorité des cas, sans présenter aucun phénomène qu'on puisse rapporter à l'intoxication tuberculeuse.

Si nous admettons qu'ils étaient infectés par le bacille dès leur plus jeune âge, nous pouvons, avec une grande part de probabilité, conclure aux résultats très encourageants de la prémunition.

Jusqu'à présent, ainsi que nous l'avons déjà dit, un seul enfant prémuni est mort de tuberculose, ce qui signifie que, dans nos familles bacillifères, la mortalité par tuberculose des nourrissons prémunis atteindrait seulement, jusqu'à un an, 2,5 p. 100. Or, nous ne connaissons pas de chiffres aussi bas de mortalité pour cette catégorie de nourrissons qui vivent dès leur naissance en milieu tuberculeux, et ce fait peut aussi servir à constater la résistance des enfants après la prémunition vis-à-vis de l'infection virulente.

Nous ne nous proposons naturellement pas de tirer dès à présent des conclusions définitives relativement aux propriétés immunisantes du BCG, car nous ignorons ce que sera l'avenir pour les enfants prémunis, mais il nous paraissait nécessaire

de faire connaître les résultats de nos observations poursuivies attentivement pendant dix-huit mois, parallèlement aux expériences faites à Kharkoff sur la prémunition des veaux, lesquelles prouvent incontestablement la résistance manifeste des animaux vaccinés à l'égard des infections intraveineuses virulentes massives.

CONCLUSIONS.

1° La prémunition des nouveau-nés *per os* par le BCG mis à la disposition de la Commission ukrainienne n'exerce aucune influence immédiate nuisible sur leur état de santé, sur leur température, ni sur leurs organes digestifs.

2° Dans les limites de durée de nos observations, nous n'avons pu relever aucun effet nuisible de la prémunition sur le développement des enfants, non plus que sur leur résistance aux autres infections exo ou endogènes.

3° La prémunition des nouveau-nés d'après la méthode de Calmette peut être envisagée comme une mesure pratiquement tout à fait inoffensive.

4° Les enfants prémunis vivant en dehors des contacts tuberculeux évidents présentent assez souvent des réactions intradermiques à la tuberculine positives, d'une intensité moyenne, et ceux qui vivent en milieu tuberculeux réagissent, le plus souvent, avec beaucoup d'intensité. On doit penser que ce dernier groupe d'enfants s'infecte par les bacilles tuberculeux virulents dès l'âge le plus précoce.

5° En tenant compte de l'allergie consécutive à la prémunition par le BCG, du développement normal des enfants, alors même que, selon toute probabilité, ceux-ci sont, de très bonne heure, infectés par des bacilles virulents dans les familles bacillifères, et aussi du pourcentage extrêmement faible de la mortalité par tuberculose de ces derniers, on peut considérer comme très encourageants les résultats de la vaccination dans les limites de nos observations.

6° Pour porter un jugement définitif, il est nécessaire de réunir avec méthode tous les renseignements possibles relatifs au développement, à la morbidité et à la mortalité des enfants non prémunis et vivant dans un entourage tuberculeux.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACTION DES ANTICORPS SPÉCIFIQUES DANS L'ORGANISME

par A. SPERANSKY.

(*Service de neurotoxicologie
de l'Institut de médecine expérimentale
et Service expérimental
de l'Institut de neuropathologie chirurgicale, à Leningrad.*)

(QUATRIÈME MÉMOIRE)

I

Une des particularités physiologiques remarquables du système nerveux central est sa *barrière hémato-encéphalique* (1).

En quoi consiste-t-elle, comment agit-elle, où est-elle située ? Ces points sont obscurs, mais son existence même est incontestable.

Un certain nombre de substances circulant dans le sang, même en grande quantité, n'apparaissent jamais au sein du système nerveux central, particulièrement dans le liquide céphalo-rachidien.

L'action de ces substances sur le cerveau ne se manifeste pas, non pas parce qu'elles n'en possèdent aucune : il suffit de les mettre en contact avec le cerveau pour qu'elles se montrent souvent très toxiques ; mais, dans les conditions ordinaires, ces substances s'arrêtent devant la barrière qui est constituée entre le sang et le milieu ambiant du cerveau (liquide céphalo-rachidien). Elles n'y pénètrent pas.

Il est évident que cette barrière est une adaptation de caractère défensif, qui sert à garder à un certain taux la constance du milieu cérébral.

(1) Cette conception a été formulée pour la première fois par Sicard. Sa détermination a été proposée, me semble-t-il, par L. Stern.

Pourtant, dans des conditions pathologiques, sa présence peut, dans certains cas, devenir franchement nuisible.

Nous ne nous arrêterons pas sur les détails de ce phénomène bien connu et qui attire à présent l'attention de beaucoup de cliniciens et de physiologistes. Nous en noterons seulement quelques particularités dont l'importance apparaîtra dans les pages suivantes (L. Stern et autres).

1^o Un grand nombre de substances toxiques, les toxines bactériennes entre autres, ne s'arrêtent pas à la barrière et pénètrent au sein du système nerveux central. Quelques-unes d'entre elles, comme la toxine tétanique, dépassent la barrière et y pénètrent en cheminant directement le long des troncs nerveux.

2^o Par contre, les anticorps des sérumsp spécifiques sont arrêtés et, dans les conditions normales, ne pénètrent pas dans le cerveau.

3^o Les toxines, parvenues au sein du système nerveux central, se fixent sur la substance cérébrale et, retenues ainsi dans le cerveau, ne sont pas éliminées.

4^o Les antitoxines sont indifférentes vis-à-vis du cerveau ; s'il arrive qu'elles y apparaissent, elles en sont assez vite éliminées (Ransom, 1901). Leur retour du sang au cerveau est entravé par la barrière.

5^o L'introduction des anticorps spécifiques dans l'espace subdural ou subarachnoïdien n'assure pas leur pénétration dans l'intérieur du cerveau. Il semble que ces espaces lui servent de milieu ambiant où il excrète, mais où il ne puise ordinairement pas.

Au cours de nos études sur le mécanisme des processus toxiques du cerveau (avec mes collaborateurs Ponomarev et Tchetchkov) nous avons été conduits à aborder pour la première fois la question de la barrière hémato-encéphalique dans des recherches sur la rage des chiens.

II

RAGE. — Dans nos recherches nous avons étudié, entre autres questions, celle de la prophylaxie de la rage.

Nos expériences antérieures prouvent qu'il n'y a aucune dif-

férence entre l'*action du sérum antirabique in vitro et in vivo*.

L'action faible ou incertaine de ce sérum dans l'organisme dépend de ce qu'il ne rencontre pas le virus.

En créant des conditions qui favorisent cette rencontre, on assure en même temps la manifestation du pouvoir spécifique du sérum.

S'il en est ainsi, il serait très intéressant d'essayer de forcer le sérum antirabique à manifester ses qualités en l'injectant, non pas dans l'espace subarachnoïdien, mais dans le sang.

On trouve dans la littérature quelques observations où le sérum antirabique en injections subdurales a produit un effet favorable (W. Pfeiler, 1913). Par contre, on ne connaît aucun cas où ce sérum, introduit dans le sang, aurait produit un effet spécifique.

On peut admettre que la cause principale de l'échec provient de ce que le passage des anticorps spécifiques, à travers la barrière hémato-encéphalique, au sein du système nerveux central, est impossible.

Parmi les moyens ayant pour but de détruire pour un certain temps cette barrière, les uns (surchauffage) paraissent trop faibles, les autres (introduction de fortes doses de toxine diptérique ou tuberculeuse) n'ont pas d'importance pratique.

Au cours d'autres expériences, nous avons pu faire une observation qui nous a donné le moyen de détruire, pour un certain temps, la barrière hémato-encéphalique par un procédé mécanique. Mon attention a notamment été attirée par le fait suivant :

Lorsqu'on évacue, chez le chien, tout le liquide céphalo-rachidien aspirable, une trépanation qui suit immédiatement, si grande soit-elle et à quelque endroit du crâne qu'elle soit pratiquée, n'est pas accompagnée d'hémorragie, ou celle-ci est minime. Le fait étant constant, nous l'avons spécialement étudié et expliqué.

Les veines de la voûte osseuse du crâne ne sont pas à proprement parler des veines des os : elles les traversent seulement. Ces veines servent de canal d'écoulement complémentaire au sang veineux du cerveau. Leur origine se trouve dans les sinus veineux du cerveau.

Comme la circulation du sang dans les vaisseaux dépend de

la différence de pression au commencement et à la fin du courant sanguin, et comme les veines osseuses prennent leur source dans les veines du cerveau, il est clair qu'en diminuant la pression à l'intérieur de la boîte crânienne et du canal rachidien enfermés dans les os et les méninges, nous pouvons ralentir et même arrêter la circulation du sang dans les veines osseuses (1).

Pendant les études de contrôle concernant cette observation, j'ai remarqué le fait suivant : si on aspire une grande quantité du liquide céphalo-rachidien chez le chien (7,0-10,0), et si on le réinjecte ensuite sans retirer la seringue de l'aiguille, puis si on l'aspire de nouveau, le liquide ne reste plus transparent. Il se montre très faiblement jaunâtre. En répétant cette manœuvre, on obtient une coloration du liquide de plus en plus prononcée. Qu'est-ce que cela veut dire ? Les vaisseaux du cerveau qui touchent presque immédiatement le tissu cérébral et ne sont aucunement soutenus dans leur parcours, ne peuvent pas supporter de brusques élévations et de brusques rechutes de la pression intracrânienne qui se succèdent aussi rapidement, et commencent à laisser passer à travers leurs parois ce qu'ils retiennent ordinairement. La région du système nerveux central se trouve alors accessible aux substances qui, dans les circonstances normales, ne peuvent pénétrer au delà des vaisseaux sanguins.

Nous avons décidé de profiter de cette observation pour favoriser la pénétration, au sein du cerveau, du sérum antirabique injecté dans le sang (expérience des D^rs A. Tchetchkov et A. Ponomarev).

Nos expériences ont été exécutées de la manière suivante : Deux lapins du même poids ont reçu dans la veine de l'oreille le sérum antirabique.

Ensuite, à l'un d'eux, le liquide céphalo-rachidien (1 cent. cube à 1 c.c. 6), aspiré par ponction suboccipitale, fut immédiatement réinjecté, puis évacué par une aspiration nouvelle. Quelquefois nous nous sommes bornés à cette manipulation, d'autres fois nous l'avons répétée encore à une ou deux

(1) Voir les détails dans le travail de mon collaborateur le Dr A. S. Vichnevsky : « Méthode pour combattre les hémorragies des os et des sinus pendant les trepanations. » *Journal de Biologie expérimentale et de Médecine*, Moscou, 1926.

reprises. Après la dernière aspiration, le liquide n'était plus réinjecté afin de produire une dépression intracranienne. Une ou deux heures après, on inoculait les deux lapins dans le cerveau (par trépanation). Nous nous servions pour l'inoculation du « virus fixe » en émulsion (non filtrée), diluée au millième. Nous avons fait plus de dix expériences semblables, sur plus de 20 lapins, avec le résultat suivant : tous les lapins de contrôle prenaient la rage et succombaient comme si le sérum n'avait pas été injecté du tout. Parmi les animaux injectés, un seul prit la rage : c'était un animal qui n'avait pas pu subir l'expérience complète à cause d'un bouchage accidentel de l'aiguille. *Tous les autres lapins restèrent sains.*

A ma connaissance, c'est la première fois que le sérum antirabique injecté dans le sang a produit son effet spécifique dans l'organisme.

Ajoutons que le sérum employé était d'un titre très faible, agissant *in vitro* à la dilution de 1 : 100. Il semble qu'à la suite de ce procédé, il pénètre dans le cerveau une quantité relativement minime d'anticorps spécifiques, puisque l'inoculation du lapin, faite vingt-quatre heures plus tard, donne la rage.

Ce procédé peut avoir aussi ses avantages, qui consistent en ce que la destruction de la barrière hémato-encéphalique embrasse pour ainsi dire tout le cerveau, et les substances spécifiques parviennent à la fois dans toutes les parties du système nerveux central.

III

DIPHTÉRIE. — La manipulation décrite plus haut n'ayant aucun caractère spécifique, il était intéressant d'étudier son influence sur d'autres processus toxiques nerveux, en premier lieu sur la diphtérie et le tétanos.

On trouve dans la littérature que l'introduction de l'antitoxine diphtérique sous la dure-mère peut être utile dans les cas graves de diphtérie avec des symptômes de lésions du système nerveux central. Bingel, par exemple (*D. Arch. f. klin. Med.*, 1911), considérait qu'il est utile d'introduire dans ces cas le sérum sous la dure-mère. Sa proposition n'a pas été suivie,

ce qui s'explique probablement par le fait que dans la grande majorité des cas la simple injection du sérum antidiptérique sous la peau et dans les muscles donne un excellent résultat.

Pour nos expériences (Dr A. Ponomarev), nous nous sommes servis des données du travail de Dönitz (*Arch. Intern. de Pharmacodyn.*, 1899).

Le schéma des expériences était le suivant : lorsqu'un lapin de 4.800-2.000 grammes reçoit dans le sang 15 D. L. M. de toxine diphtérique et, une heure après, 1.850 unités d'antitoxine, il périra le troisième jour.

Nous avons reproduit exactement cette expérience avec cette différence que cinq-dix minutes après l'introduction du sérum antitoxique nous procédions à l'évacuation du liquide céphalorachidien et aux aspirations et réinjections répétées décrites plus haut (1).

Nous appelons ce procédé le « pompage » et nous allons nous servir de cette dénomination — peut-être inadéquate — dans les pages suivantes.

Les premières expériences ont été faites sur 18 paires de lapins. Les 18 lapins de contrôle périrent tous, comme c'est la règle.

Parmi les lapins soumis à cette expérience, 5 restèrent sains ; 11 survécurent aux témoins de trois-cinq jours, et 2 périrent en même temps que les témoins.

Nous avons alors modifié le schéma de l'expérience en introduisant le sérum dans la veine de l'animal, non pas une heure après la toxine, comme l'avait fait Dönitz, mais au bout de quarante-cinq minutes. *Dans ces conditions tous nos animaux d'expérience restèrent vivants tandis que tous les témoins périrent.*

La cause principale de la mort par la toxine diphtérique est donc une lésion du système nerveux central; ainsi la pénétration de l'antitoxine dans le cerveau, renforcée par « pompage », doit être très utile. Dans ces conditions la maladie ne se développe pas.

(1) Pour faire la ponction de la dure-mère nous nous servons de la narcose à l'éther. Le lapin de contrôle qui n'est pas soumis à la ponction est aussi narcotisé pour que les conditions de l'expérience soient égales.

IV

TÉTANOS. — Les expériences sur le tétanos ont été faites sensiblement d'après le même schéma. Je m'abstiendrai donc de les rapporter en détail.

Tous les animaux d'expérience survécurent plus ou moins aux témoins. Mais, pratiquement, cette expérience n'a pas donné de résultat parce que, finalement, tous les animaux ont péri. Cela s'explique probablement par la fixation extrêmement intense de la toxine tétanique par la substance cérébrale, qui est si caractéristique pour cette toxine.

Pourtant, dans nos expériences sur les hommes atteints de tétanos, nous avons obtenu une série de guérisons par l'injection du sérum spécifique dans le canal rachidien, après évacuation maximale du liquide céphalo-rachidien suivie d'une hyperémie *ex vacuo* dans l'espace subdural.

V

DYSENTERIE. — Des expériences sur la toxine dysentérique ont été faites d'après la même méthode sur des lapins (1), en ne modifiant que les intervalles et la quantité des substances réagissantes. Elles ont donné, en général, le même résultat. Notamment les lapins, dont le liquide céphalo-rachidien était « pompé » après l'injection intraveineuse de l'antitoxine, ne devinrent pas malades ou survécurent de beaucoup aux témoins.

Nos expériences sur DES LAPINS DÉJA MALADES, que nous avons traités avec le sérum antidysentérique, donnèrent aussi un résultat très intéressant.

Après l'apparition de la diarrhée sanguinolente, et surtout après les premiers symptômes de paralysie, nous n'avons jamais obtenu aucun effet avec *le sérum introduit dans le sang*. Mais, dans plusieurs cas, nous avons obtenu un bon effet curatif avec la même quantité de sérum, lorsqu'on l'introduisait simultanément *dans le sang et sous la dure-mère*.

(1) Introduction intraveineuse.

Nous avons obtenu quatre fois la guérison de lapins dont la maladie était très avancée.

Il faut noter que la seule introduction du sérum antidysentérique dans l'espace subdural produit aussi un effet curatif, mais plus faible que celui qu'on obtient en introduisant le sérum des deux côtés de la barrière, c'est-à-dire *dans le sang et sous la dure-mère simultanément*. *L'injection du sérum dans le sang seulement ne nous a donné aucun effet curatif.*

Fait intéressant : Pour avoir un résultat après l'introduction subdurale du sérum, il n'était pas nécessaire d'aspirer de grandes quantités de liquide céphalo-rachidien et de vider le sac de la dure-mère. Il semble que la toxine dysentérique ne se fixe pas solidement sur la substance cérébrale et s'en détache facilement en raison de la grande activité vis-à-vis d'elle de l'antitoxine du sérum.

Nous nous vîmes forcés, par ces expériences, d'admettre que *la pénétration des anticorps spécifiques au sein du système nerveux central, dans la dysenterie, est une condition essentielle de l'action curative du sérum.*

Or nous possédons une grande quantité d'autres sérums dont l'action est faible ou incertaine, ou ne se manifeste point dans l'organisme.

Pour le sérum antirabique, nous nous sommes assurés que cela dépend de ce que le sérum et le virus ne se rencontrent pas dans l'organisme.

Il est bien possible que les sérums mentionnés ne se rencontrent pas non plus avec les toxines correspondantes dans l'organisme, *du moins avec la fraction des toxines qui a pénétré dans le tissu nerveux et auquel elle s'est fixée plus ou moins solidement.*

Nous avons déjà fait des expériences avec le sérum antistaphylococcique polyvalent, les sérums antityphiqe et anticholérique. Les résultats diffèrent de ceux décrits plus haut en ce que l'action de ces sérums ne dépend probablement pas de leur pénétration au sein du cerveau, ou dépend beaucoup moins, comme c'est le cas de sérum antitoxiques.

L'étude de cette question est rendue difficile par le fait que beaucoup de maladies infectieuses ne peuvent pas être reproduites chez les animaux ; d'autres ne s'observent que chez des

petits animaux (rats, souris, cobayes) qui ne peuvent servir à nos expériences à cause de leurs petites dimensions.

Enfin d'autres, comme le choléra et la fièvre typhoïde, sont difficiles à reproduire chez les animaux; des expériences semblables ne peuvent pas être bien analysées et dûment contrôlées. Nous étions donc forcés de nous adresser au matériel clinique.

VI

SCARLATINE. — On emploie à présent dans le traitement de la scarlatine un sérum antitoxique. La spécificité de son action est plus ou moins établie. Il a cette particularité qu'il faut l'injecter en grandes quantités [100 à 200 cent. cubes] (1) sinon son effet est nul.

Il est connu que les substances qui ne sont pas capables de franchir la barrière hémato-encéphalique acquièrent cette capacité pour un certain temps si leur concentration dans le sang surmonte la limite du « seuil de pénétration ».

On peut donc admettre que, seule, l'introduction de grandes doses du sérum antiscarlatineux donne lieu à la pénétration d'une partie des anticorps au sein du système nerveux central et que *cette pénétration est justement la condition indispensable d'un résultat complet.*

S'il en est ainsi, le seul contact de l'antitoxine avec le cerveau devrait donner une réaction spécifique plus ou moins manifeste.

Nous nous sommes adressés au chef de l'hôpital S. P. Botkine, le Dr Ivachentzow, avec la proposition de réaliser ces essais.

Les Drs Kotov, Kotliarènko et mon collaborateur Ponomarev ont fait dans cet hôpital une série d'observations sur l'action du sérum antiscarlatineux en *ne l'introduisant que dans l'espace subarachnoïdien.*

Dans tous ces cas, le sérum ne fut injecté ni dans le sang, ni dans les muscles. Les expériences portent sur 36 cas. Le sérum fut introduit par ponction lombaire. Sa quantité variait de 4 à 10 cent. cubes. On ne choisissait pour l'expérience que des cas

(1) Sérum antiscarlatineux, préparation russe.

de scarlatine présentant des symptômes nets et d'une gravité moyenne ou très graves (15 cas). Dans 31 cas, on obtint un effet curatif complet : chute de la température jusqu'à la normale, disparition de l'exanthème, amélioration de l'état général. Dans 2 cas, l'effet fut moins bon ; dans 1 cas, on n'obtint aucun effet appréciable quoique le malade guérit. Enfin, dans 2 cas, la mort survint quelques heures après l'introduction du sérum. Ces deux cas présentaient une scarlatine très grave et l'un de ces malades fut soumis au traitement à l'état d'agonie.

On peut donc constater que l'introduction subdurale seule de petites quantités de sérum antiscarlatineux donne dans certains cas un effet spécifique. *Un tel résultat ne peut pas être obtenu après l'injection de la même quantité du sérum dans le sang, les muscles ou sous la peau.* Il faut donc admettre que, dans la scarlatine, *la pénétration des anticorps spécifiques au sein du système nerveux central est une condition indispensable pour l'efficacité du sérum antiscarlatineux.*

Le point le plus intéressant dans ces expériences sur la scarlatine est que les doses, même minimes (4 cent. cubes 5 à 5 cent. cubes) (1) de l'antitoxine, introduites au sein du cerveau, non seulement améliorent les symptômes dits nerveux, mais abaissent la température, améliorent le pouls, amènent une rapide décoloration, puis la disparition de l'exanthème. *Il se produit une atténuation ou une disparition de presque tous les symptômes appréciables de la scarlatine, et tout cela malgré la présence dans l'organisme d'une toxine libre (non neutralisée par l'antitoxine).* Plus loin, à propos de nos expériences sur la rougeole, je devrai revenir sur ce fait.

VII

ROUGEOLE. — Les manifestations morbides externes de la rougeole et du typhus exanthématisques sont assez semblables à celles de la scarlatine : un début brusque, une affection toxique du système nerveux et un exanthème. L'emploi prophylactique du sérum de convalescents de rougeole est maintenant généra-

(1) Nous avons trouvé depuis qu'il est préférable d'introduire le sérum aux doses de 8 à 10 cent. cubes. (Préparation de l'Inst. de Méd. expérimentale).

lisé. Ce sérum possède aussi un effet curatif. Les circonstances ne nous ont permis jusqu'à présent d'employer ce sérum que rarement. Nous injections le sérum des convalescents, toujours par ponction subarachnoïdienne, par 8-10 cent. cubes. Dans tous les cas, l'introduction subdurale du sérum de convalescents de rougeole a donné un résultat complet. Deux faits méritent une attention spéciale (cas des Drs Kotov, Kotliarenko et Ponomarev).

Premier fait. — Contamination à l'hôpital même. Trois enfants tombent malades à la fois. Ils présentent tous des taches de Koplik aux muqueuses des joues. Ils reçoivent simultanément la même quantité de sérum ; deux, dans le sang ; le troisième, sous la dure-mère.

Les deux premiers ont une rougeole nette le jour suivant et leur maladie suit son cours habituel. Chez l'enfant qui a reçu le sérum sous la dure-mère, l'exanthème est retardé de cinq jours. Il apparaît enfin pendant un jour sous une forme légère accompagnée de peu de fièvre ; vingt-quatre heures après, tous ces symptômes disparaissent.

Ce fait présente un grand intérêt. Comment l'interpréter ? Nous avons introduit dans le sang des deux malades *une quantité d'antitoxine trop faible pour pouvoir neutraliser toute la toxine ou tout le virus contenus dans l'organisme.*

Cela est évident, puisque l'injection n'a pas arrêté le début de la maladie et n'a exercé aucune influence sur son cours habituel.

Le troisième malade a reçu dans l'espace subdural la même quantité d'antitoxine qui, elle aussi, était insuffisante pour neutraliser toute la toxine se trouvant dans l'organisme. Pourtant, le début de la maladie fut retardé de cinq jours. Durant cette période, la toxine qui pénétrait dans le système nerveux était neutralisée par l'antitoxine, et cela suffisait pour écarter tous les symptômes de la maladie.

Cinq jours après, le système nerveux central se débarrassa de l'antitoxine, son blocage prit fin, et la toxine qui se trouvait encore dans l'organisme pénétra dans le cerveau en provoquant les symptômes d'une maladie générale. Ces symptômes furent faibles et de courte durée.

Tandis que l'antigène de la rougeole circulait dans le sang, sans manifester ses propriétés toxiques, sa fonction immuni-

sante suivait son cours. Cinq jours après, lorsqu'apparurent les premiers symptômes morbides, l'immunisation active touchait à sa fin.

Si l'antitoxine avait été retenue dans le cerveau un jour de plus, nous aurions écarté l'idée que l'enfant était « malade » et nous aurions pensé qu'il avait acquis une immunité active vis-à-vis de la rougeole. Qu'est-ce donc que la rougeole (de même que la scarlatine) ? si, malgré la présence de la toxine, ou du virus, libre dans l'organisme, aucun de ses symptômes ne peut se manifester dès que le système nerveux seul est bloqué ?

Deuxième fait. — Le sérum d'un convalescent de rougeole fut injecté à un enfant malade au commencement de la période de l'exanthème. Douze heures après, chute critique de température, même au-dessous de la normale ; l'exanthème disparaît et la malade guérit promptement.

Dans ce cas, la rougeole était compliquée d'un foyer pneumonique dans un des poumons. La résolution eut lieu presque en même temps que la disparition des autres symptômes et, vingt heures après, il n'était plus possible de retrouver ce foyer.

Une telle influence du système nerveux central sur les foyers locaux fut observée maintes fois dans nos expériences et mérite une attention particulière.

VIII

MÉNINGITE ÉPIDÉMIQUE CÉRÉBRO-SPINALE. — L'étude des processus déterminés par la localisation de l'antigène dans le cerveau même représente une partie spéciale de nos recherches. Parmi ces processus se range la méningite cérébro-spinale épidémique, dont les procédés de traitement sont très différents.

Un certain rang, parmi ces procédés, est occupé par l'autovaccination qui donne, dans nombre de cas, un effet favorable.

On peut admettre que l'immunisation active de l'organisme, pendant la méningite épidémique, commence presque dès le début de la maladie. On peut aussi admettre que, vers le début de l'autovaccination artificielle, le sang possède déjà une certaine quantité d'anticorps spécifiques, mais petite. Celle-ci n'atteint pas le « seuil de pénétration » en dedans du système nerveux central. L'autovaccination artificielle donne seule-

ment, au processus d'immunisation active déjà en cours, une poussée complémentaire et lui permet ainsi d'atteindre rapidement un taux efficace.

De cette façon le malade « porte en lui-même sa pharmacie, ne possédant pas de clef pour s'en servir ». Nous avons acquis, avec le procédé du « pompage » un moyen de détruire temporairement la barrière hémato-encéphalique qui enfrave la pénétration des anticorps spécifiques au sein du cerveau.

Comme les malades souffrant de méningite épidémique exigent des ponctions répétées du sac de la dure-mère, nous avons décidé d'y ajouter encore le « pompage ». Le traitement par le « pompage » a été mis à l'épreuve par le Dr I. K. Panferov, chez 4 enfants méningitiques. Le « pompage » était effectué par ponction lombaire à l'aide d'une sonde Record de 10 et de 20 cent. cubes. Le liquide céphalo-rachidien était aspiré et réinjecté plusieurs fois de suite (1). Puis, ayant finalement rejeté ce liquide, on reprenait le « pompage » encore une fois, on vidait la seringue de nouveau, et ainsi de suite... La quantité du liquide céphalo-rachidien de l'espace subarachnoïdien diminuait graduellement, jusqu'à ce qu'il n'en reste que la quantité qu'on y laisse d'habitude après les ponctions. Les quatre malades guérirent très vite.

Je suis bien loin de croire ce nombre de cas suffisant pour une conclusion définitive quelconque. Pourtant je dois insister sur le fait que *ces quatre cas, traités tout de suite, présentaient tous (deux surtout) une forme très grave, et, chez tous, la période d'amélioration coïncida plus ou moins franchement avec le commencement du « pompage »; chez tous les quatre la guérison fut complète.*

Un de ces quatre cas présente une particularité intéressante. Le jour même du « pompage » la température s'abaissa jusqu'à la normale, en même temps tous les autres symptômes s'amélioraient. Le lendemain, l'état restait bon; le troisième jour et les jours suivants, la température s'elevait lentement et l'état général s'aggravait. Dès qu'on faisait le « pompage », la température s'abaissait et tout le tableau se répétait de nouveau. Peu à peu la maladie céda; une guérison complète eut lieu.

(1) Pas trop lentement.

Dans tous ces cas, le « pompage » était répété tous les deux à quatre jours. Le nombre total des « pompages » était différent et dépendait du caractère individuel de chaque cas (1).

IX

Si l'on admet que le traitement de la méningite épidémique par le « pompage » a eu un succès réel, l'idée s'impose d'essayer cette méthode dans d'autres processus où l'antigène se localise dans le cerveau.

En premier lieu il faut mentionner les différentes formes des lésions syphilitiques du cerveau (*lues cerebri, tabes dorsalis*) et le parkinsonisme post-encéphalique.

X

On voit que notre étude est loin d'être terminée. Il serait par conséquent imprudent d'en tirer des conclusions, encore moins des propositions pratiques. Ces dernières exigent une réserve particulière, puisque les données expérimentales ne peuvent pas toujours être appliquées à la clinique, même lorsqu'elles sont tout à fait exactes et justes. S'il était définitivement prouvé qu'on peut juguler la rougeole en introduisant sous la dure-mère de petites quantités de sérum de convalescents, cela ne saurait signifier qu'il faut le faire. Il peut aussi être démontré que l'injection de 100-200 cent. cubes de sérum antiscarlatineux sous la peau ou dans les muscles est, pour certaines raisons, plus avantageuse que l'introduction de 10 cent. cubes sous la dure-mère. La clinique a ses propres raisons ; elle est dirigée par des tendances qui sont étrangères et parfois nuisibles à l'expérimentation. Nous croyons néanmoins que nos résultats sont dignes d'attention, et je tiens à formuler quelques hypothèses pouvant être utiles aux futures recherches.

1^o Les données citées ci-dessus portent à admettre que l'apparition des symptômes d'une maladie « généralisée » ne

(1) Ce traitement peut être appliqué dès la fin de la deuxième ou au commencement de la troisième semaine de la maladie.

signifie autre chose que l'implication du système nerveux central dans le processus morbide. Par conséquent, la condition indispensable pour qu'une maladie générale se déclare, c'est que sa toxine (ou son virus) pénètre au sein du système nerveux central.

2° Beaucoup de phénomènes morbi-les considérés comme lésions locales ne le sont pas en réalité, mais indiquent seulement une affection des régions correspondantes du système nerveux central. Cela implique la nécessité d'élargir la conception des symptômes nerveux (cérébraux).

3° Les propriétés spécifiques de beaucoup de sérums antitoxiques ne se manifestent qu'à condition que leur pénétration puisse se faire jusqu'au sein du système nerveux central.

La condition nécessaire d'un traitement par immunisation passive, c'est l'immunisation du système nerveux central. Une telle immunisation se réalise avec plus de difficulté que celle des autres organes et tissus.

4° La fixation des toxines (virus) par la substance cérébrale n'est pas toujours également stable. Quelquefois elle peut être facilement détruite (dysenterie, rougeole, en quelque mesure diptérie et scarlatine), d'autres fois difficilement. C'est pourquoi le mode d'emploi des antitoxines doit varier.

5° Il est possible que l'évacuation du liquide céphalo-rachidien, créant une hyperémie « *ex vacuo* », modifie pour un certain temps la circulation des liquides dans le cerveau. Dans ces conditions l'accès des parties profondes du cerveau aux substances introduites dans l'espace subarachnoïdien devient plus facile.

6° L'oscillation rapide de la pression dans l'espace subdural (le « pompage ») est suivie d'une altération temporaire de la perméabilité des parois des vaisseaux sanguins du cerveau (destruction temporaire de la barrière). L'accès du cerveau aux anticorps circulant dans le sang devient alors plus facile.

7° Le degré de l'immunité des organes peut ne pas être le même. Tandis que tous les organes peuvent être défendus par les anticorps du sang, le cerveau peut rester vulnérable.

8° Dans certains cas de traitement par introduction des sérums spécifiques au sein du système nerveux central, l'organisme continue à s'immuniser activement (rougeole).

ROLE DU B. OEDEMATIENS DANS L'ÉTIOLOGIE DE L'HÉPATITE INFECTIEUSE NÉCROSANTE (BRAXY) DU MOUTON AUSTRALIEN

par A. W. TURNER et J. DAVESNE (1).

(*Institut Pasteur, Laboratoire de M. Weinberg.*)

Le terme danois de *Bradsot* et le terme anglais de *Braxy* désignent en Europe une affection enzootique des moutons caractérisée au point de vue clinique par une mort rapide survenue chez les animaux n'ayant présenté aucun symptôme morbide important, et au point de vue anatomo-pathologique par une véritable infection gangrénouse de la caillette, ou quatrième estomac du mouton. Le V. septique est l'agent habituel de cette traumatose ; on le retrouve au point d'infection locale, dans les divers organes et dans le sang du cœur des animaux qui succombent.

Depuis une soixantaine d'années, les éleveurs de moutons de la région sud-est de l'Australie voient sévir sur leurs troupeaux une affection cliniquement semblable à celle observée en Europe. Cette ressemblance clinique a porté S. Pottie (1893) à proposer, pour la caractériser, le nom de *Braxy*. Mais les termes employés varient suivant les contrées : *Braxy* en Victoria, *Black-Disease* (maladie noire) en Nouvelle-Galles du Sud, désignent une même affection, cliniquement très proche du *Braxy* européen, mais dont les lésions anatomo-pathologiques et l'étiologie sont différentes.

Il existe relativement peu d'observations scientifiques sur cette maladie. L'enquête de J. D. Stewart (1901) est demeurée infructueuse ; de même les recherches effectuées de 1901 à 1913 par le laboratoire du Bureau de Microbiologie de l'Etat de

(1) C'est grâce à la Fondation Rockefeller (International Education Board) que l'un de nous a pu venir travailler à l'Institut Pasteur. Nous lui en sommes profondément reconnaissants.

Nouvelle-Galles du Sud. En 1910, Gilruth, étudiant une maladie des moutons de Tasmanie, isole des animaux morts un microbe qu'il juge agent spécifique de l'affection et qu'il retrouve en 1911 dans des cas de *Braxy* en Victoria. Mais les rapports du Bureau de Bactériologie du Ministère de la Santé publique concluent en 1913 que le germe isolé par Gilruth n'a pas été retrouvé, en Nouvelle-Galles du Sud, dans des cas de *Black-Disease*.

C'est à Dodd que nous devons les premières études cliniques et bactériologiques complètes sur cette question. De 1914 à 1926, cet auteur s'est attaché à l'étude systématique de la maladie des moutons. Il a publié en 1918 un travail très complet sur l'historique de cette affection, sa répartition, son aspect clinique, et les lésions anatomo-pathologiques qui lui sont propres. C'est dans ce travail que nous avons puisé de nombreux renseignements. Mais, à cette date, Dodd n'apportait encore aucune donnée bactériologique, n'ayant pu reproduire la maladie par aucun des nombreux germes qu'il avait isolés. En 1921, il complète sa première étude par la description d'un microbe anaérobio que il pense être l'agent de la maladie et que nous étudierons plus loin. La même année (1921), H. Albiston, le collègue de l'un de nous à l'Institut de recherches vétérinaires de Melbourne, isole le microbe dont nous avons fait l'étude complète. Tout récemment (1927), cet auteur a proposé, pour éviter tout malentendu, le nom d'*hépatite infectieuse nécrosante (infectious necrotic hepatitis)* pour la maladie du mouton australien que nous allons étudier.

Notre exposé comprendra deux parties : une première partie clinique ; une seconde, bactériologique.

I. — ÉTUDE CLINIQUE.

La maladie sévit avec une assez grande intensité dans les contrées Sud-Est de l'Australie. Sa période de plus grande fréquence varie selon les climats : en Nouvelle-Galles du Sud, la plus grande mortalité a lieu de la fin de l'été à la fin de l'automne ; en Victoria, de l'été au début des pluies d'hiver. Il existe dans les propriétés de véritables « champs maudits », sur lesquels la mortalité est plus considérable. Les éleveurs

changent leurs troupeaux de pâture ; ainsi, toute la propriété peut arriver à être contaminée.

Les animaux jeunes semblent mieux résister à l'infection que les animaux plus âgés. II. Albiston, en Victoria, a vu seulement les bêtes adultes, au-dessus de quinze mois, prendre la maladie ; cependant, Dodd, en Nouvelle-Galles du Sud, l'a observée chez des animaux âgés de six à douze mois. Le sexe des moutons semble ne jouer aucun rôle dans la fréquence de contamination.

Il est difficile de savoir d'une manière rigoureuse les dégâts causés parmi les troupeaux. En effet, l'éloignement des élevages en Australie rend difficile l'établissement de statistiques exactes ; il faut aussi tenir compte de la dissimulation des propriétaires qui ne déclarent guère spontanément la mortalité survenue parmi leurs moutons, par crainte d'une mauvaise réputation de leurs établissements ; ainsi, il est encore difficile à l'heure actuelle d'obtenir des fermiers qu'ils préviennent un vétérinaire bactériologiste, dès qu'ils ont constaté un cas de l'affection.

Le préjudice causé à l'Australie par le *Braxy* est considérable. Dodd, en 1918, rapporte qu'on l'avait estimé à 100.000 livres en moyenne par année, et le prix des moutons n'était pas à cette époque aussi élevé que maintenant. Cette mortalité est d'ailleurs variable suivant les années : exceptionnellement basse une année, elle peut atteindre l'année suivante jusqu'à 20 et 25 p. 100 de l'élevage. Dodd a vu lui-même des mortalités considérables, s'élevant jusqu'à 3.000 bêtes dans une seule propriété.

Le pronostic de l'affection est essentiellement sévère. Les fermiers considèrent comme perdue toute bête malade.

SYMPTOMATOLOGIE. — Les symptômes morbides sont, en général, peu apparents. On trouve le plus souvent les animaux morts le matin. Il est cependant possible de dépister les bêtes malades. Il suffit de chasser le troupeau assez rapidement devant soi. On voit alors quelques moutons retardataires qui ne peuvent suivre le gros de la troupe ; ils semblent avoir de la peine à marcher. Si on persiste à les chasser, ils se couchent bientôt, mais souvent dans une position particulière : on sait

que le mouton, pour se reposer, se couche habituellement sur le flanc; au contraire, le mouton atteint d'hépatite infectieuse s'étend habituellement en décubitus sternal, les pattes antérieures repliées sous le poitrail. L'animal est complètement apathique: atteint d'une maladie infectieuse courante, il se défendrait avec violence, par des coups de pieds, contre l'examen; atteint d'hépatite infectieuse, il ne fait aucun mouvement de défense et se laisse complètement manœuvrer. La respiration haletante, le mouton succombe habituellement quinze à trente minutes, plus rarement une heure après s'être couché.

Quand on trouve un animal mort, si la mort remonte seulement à quelques heures, le cadavre a gardé la position de décubitus sternal; autour de lui, nulle trace de lutte agonique; il ne s'est pas débattu avant de mourir, comme font souvent les animaux dans presque toutes les maladies infectieuses.

Ajoutons qu'au cours des phénomènes morbides, l'hyperthermie est en général peu accusée.

LÉSIONS ANATOMO-PATHOLOGIQUES. — On constate à l'autopsie que la plupart des moutons frappés par la maladie sont les plus florissants du troupeau: leur tissu adipeux est très développé et leur toison épaisse. Le tissu cellulaire sous-cutané abdominal forme une sorte de gelée rosée qui devient rapidement noirâtre; ses vaisseaux sont congestionnés. A l'ouverture du sac péritonéal, on note parfois un exsudat clair, d'abondance variable. Ce liquide peut infiltrer la paroi abdominale et parfois les tissus périrénaux. La rate et les reins sont un peu congestionnés. Les capsules surrenales ne présentent rien de particulier. La muqueuse de la caillette est souvent un peu congestionnée, surtout au niveau du pylore; dans certains cas observés par Dodd, elle était presque hémorragique. On ne constate jamais de véritable nécrose ou d'œdème de la caillette, comme dans les cas de *Bradsot* et de *Braxy* européens. Les intestins sont normaux, les ganglions mésentériques légèrement enflammés. Dans la vessie, l'urine est de quantité et de couleur normales.

Les lésions du foie sont particulièrement intéressantes. Cet organe est légèrement hypertrophié, de couleur rouge sombre,

congestionné. Extérieurement, on constate, toujours suivant Dodd, dans de nombreux cas suivant les recherches de H. Albiston, la saillie des voies biliaires sous la masse hépatique : aspect caractéristique de la présence de douves. H. Albiston a cependant fait quelques autopsies d'animaux morts de *Braxy* typique sans rencontrer ces parasites. La vésicule biliaire est distendue. Le foie montre presque toujours un ou plusieurs foyers de nécrose, très souvent sur la surface viscérale. Ces foyers, blanc-grisâtre ou jaune sale, ont une consistance assez dure ; ils n'ont pas d'odeur ; ils sont irrégulièrement circulaires ; leurs bords irréguliers sont nettement marqués ; leur diamètre est variable : de 3/4 de centimètre à 5 centimètres.

A la coupe, l'organe est très congestionné : le sang vient sourdre à la surface de section. Il est très rare qu'on ne constate pas en même temps de foyers de nécrose profonds, dans l'épaisseur du viscère, en moyenne deux ou trois, et cela même quand la surface extérieure n'en présente aucun. Toutefois, il est des cas très rares où l'on ne trouve aucun foyer nécrotique, même en coupant l'organe dans tous les sens. Les lésions microscopiques sont les suivantes : en dehors des foyers, les cellules présentent de la dégénérescence granuleuse et les capillaires sont gorgés de sang ; au niveau des foyers, autour d'un point central de nécrose, existe une zone assez épaisse et nettement délimitée d'infiltration leucocytaire. Entre la zone nécrotique et la zone d'infiltration leucocytaire, se trouve une couronne de bacilles enchevêtrés. On trouve aussi des bacilles dans la masse nécrotique. Nous étudierons ces bacilles dans la partie bactériologique de notre exposé.

En ouvrant le thorax de l'animal, on est frappé par la forte distension du sac péricardique. L'épanchement qui le distend est d'importance variable et peut atteindre 50 à 100 cent. cubes ; il est constitué par un liquide jaune citrin, très rapidement coagulable, dont la coagulation peut être effectuée à l'autopsie si la mort remonte à plusieurs heures déjà. Cette particularité de l'épanchement péricardique fait dire aux fermiers que les moutons ont un « sac de gelée » autour du cœur. Au niveau du cœur gauche il existe souvent à la surface de l'endocarde et du revêtement viscéral du péricarde quelques petites ecchymoses.

Les poumons ne sont pas altérés. La plèvre contient presque toujours un épanchement d'importance variable.

Telles sont les caractéristiques de cette affection : cliniquement, ce qui est frappant, c'est « l'absence de symptômes » ; au point de vue anatomo-pathologique, ce sont les foyers nécrotiques du foie et les épanchements sérieux, dont le plus marqué et le plus constant est l'épanchement péricardique, qui individualisent la maladie.

II. — ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE.

Des nombreuses recherches bactériologiques effectuées pour découvrir l'agent microbien du *Braxy*, celles de trois auteurs ont seules donné des résultats positifs : Gilruth (1910-1911), Dodd (1918-1921), Albiston (1921 et 1927).

A. RECHERCHES DE GILRUTH (1910-1911). — Cet auteur, en étudiant une épidémie, a pratiqué deux autopsies de moutons en Tasmanie. Chez l'un, qui semblait malade et fut sacrifié, il trouva, en l'examinant immédiatement après la mort, une tache gangréneuse de 10 cm² environ sur la muqueuse de la caillette, près du pylore ; cette tache nécrotique entourée d'une zone foncée rouge-verdâtre, œdématiée, présentait le véritable aspect du *Braxy* européen. Il n'y avait pas d'œdème sous cutané, mais des épanchements des séreuses. Gilruth ne donne pas le résultat de l'examen bactériologique de ce cas. Dans un deuxième cas, l'autopsie, effectuée l'après-midi, d'un animal mort le matin, lui montra surtout des lésions cadavériques. Il ne nota aucune lésion stomacale, mais des épanchements péritonéal (600 cent. cubes), pleural (300 cent. cubes), péricardique (100 cent. cubes). De plus, il trouva des taches nécrotiques sur la surface du foie. Des nombreuses espèces microbiennes isolées au cours de cette autopsie, Gilruth retient un bacille anaérobiose qu'il juge agent spécifique de la maladie. Ce bacille est un bâtonnet court, long de 4 à 6 μ, large de 0 μ 8 immobile, gardant la coloration de Gram, donnant des spores à l'extrémité du corps bacillaire ou au centre. Il pousse bien dans les milieux au sérum, donne des gaz dans le sérum et le bouillon au sérum en dégageant une odeur de putréfaction. Il est hém-

lytique. Il est *pathogène*, tue le mouton à la dose de 1 cent. cube de culture de quelques heures en dix-huit heures, à la dose de 1/4 cent cube en trente-six heures (l'auteur ne précise pas la voie d'inoculation). L'animal présente des lésions gangrénées typiques avec œdème sous-cutané, épanchement séreux hémorragique, bulles de gaz, odeur nauséabonde ; le foie et les reins sont congestionnés ; il existe souvent des taches de nécrose du foie. Les renseignements donnés par Gilruth ne sont pas suffisants pour permettre l'identification du microbe isolé. Plus tard (1912), cet auteur, étudiant la maladie des moutons de Victoria, isole un bacille très voisin de celui qu'il avait trouvé en Tasmanie. Il en diffère par sa légère mobilité ; il est plus large ; il dégage une odeur moins fétide, donne moins de gaz et liquéfie plus lentement la gélatine. Mais les animaux vaccinés contre la souche de Tasmanie sont protégés contre celle de Victoria et vice versa.

B. RECHERCHES DE DODD. — En 1918, Dodd décrit plusieurs bacilles aérobies et anaérobies isolés des animaux morts de *Black-disease* australien. Avec aucun de ces bacilles il n'a pu reproduire la maladie ni tuer le mouton. C'est à cette époque qu'il décrit, le premier, la couronne de bacilles autour des foyers nécrotiques du foie. Dans un cas, il isole de ces foyers un bacille anaérobio long, épais, non pathogène pour le cobaye ni le lapin en injection sous-cutanée, et considère ce germe comme un envahisseur cadavérique. En 1921, il décrit comme agent du *Black-disease* en Nouvelle-Galles du Sud un microbe anaérobio isolé des mêmes foyers nécrotiques ; ce bacille se trouve également dans les cultures du parenchyme hépatique dans des cas sans foyers nécrotiques ; il présente les caractères suivants :

Bacille immobile, gardant la coloration de Gram, long de 4 à 7 μ en moyenne, large de 0 μ 8 à 1 μ 2 ; ses extrémités sont arrondies ; il se présente tantôt sous forme d'éléments isolés, tantôt sous forme de diplobacilles dans les milieux artificiels. Ce microbe est sporulé ; les spores sont terminales ou subterminales, nettement ovalaires ; leurs dimensions sont de 1 μ 75 à 2 μ 75 sur 1 μ 25. Elles ne se forment pas dans les milieux contenant du glucose, mais facilement dans les milieux au sérum.

En bouillon ordinaire, la culture est pauvre; il n'y a pas de dégagement de gaz; en bouillon au sérum, la culture est abondante et se dépose en vingt-quatre à trente-six heures au fond du tube après être tombée en flocons; en bouillie de foie et en bouillie de cerveau, la culture est très riche et les spores se forment très abondamment; la bouillie de cerveau n'est pas noircie; la culture est également riche dans le bouillon à l'œuf alcalin. En gélose profondeensemencée par piqûre, le microbe se développe le long de la piqûre en moins de vingt-quatre heures sans donner de bourgeons latéraux; il se forme du gaz qui fait éclater le milieu. L'influence des divers milieux sur la conservation de la vitalité et de la virulence du microbe est variable: dans le bouillon au sérum glucosé et en gélose profonde la culture meurt rapidement; sa virulence est atténuée en présence de glucose, et se conserve intacte dans la bouillie de foie. Le bacille isolé par Dodd est protéolytique; il peptonise le lait en vingt-quatre heures avec dégagement de gaz; en quarante-huit heures, tout le lait est peptonisé et un liquide trouble comme du petit-lait surmonte un coagulum mou qui est au fond du tube; l'odeur est très désagréable dans ce milieu.

Pouvoir pathogène. — Les cultures jeunes tuent le cobaye à la dose de 1 cent. cube (injection sous-cutanée) en vingt heures. Avec de plus petites doses, de $1/5$ à $1/2$ centimètre cube, le cobaye peut survivre plusieurs jours. Il existe un œdème considérable de la patte inoculée dont la peau tendue est violacée. Les tissus sous-cutanés, au point d'inoculation, sont saturés d'un liquide légèrement trouble; il n'y a pas de gaz. L'œdème s'étend le long de l'abdomen et va souvent jusqu'aux aisselles; il est plus marqué du côté inoculé. Les muscles, au point d'inoculation, ont par endroits un aspect grisâtre de nécrose débutante. Si l'injection a été faite dans les muscles, ceux-ci ont à l'endroit de l'injection une odeur désagréable qui n'est pas absolument celle de la putréfaction. Il peut exister une petite quantité d'xsudat péritonéal, mais ce fait n'est pas constant. L'estomac et l'intestin, la rate, les reins et le foie sont très congestionnés. Si la maladie a duré vingt-quatre heures ou plus, on trouve dans de très rares cas des foyers nécrotiques du foie. Le péricarde est presque invariablement distendu par un xsudat clair, incolore. Il est de règle de voir les bacilles

confinés au point d'inoculation et dans l'exsudat sous-cutané, dont on peut les isoler en cultures pures ; ils deviennent de plus en plus rares à mesure qu'on s'éloigne du point d'inoculation. Chez le *lapin*, on retrouve également le bacille au seul point d'inoculation ; les doses mortelles pour cet animal sont plus élevées que pour le cobaye ; l'épanchement péricardique est souvent considérable. La *poule* et le *pigeon* sont sensibles au bacille que l'on retrouve chez ces animaux au point d'inoculation : il n'y a pas d'épanchement péricardique.

Chez le mouton. — Dodd n'a obtenu aucun résultat par l'ingestion de cultures jeunes, sporulées, malgré l'adoption de nombreux artifices pour éviter la destruction des microbes par les sucs digestifs. En injection *sous-cutanée* ou *intramusculaire*, des doses minimes, jusqu'à $1/4$ de centimètre cube, produisent des troubles locaux, mais ne sont pas toujours fatales. Des doses de $1/2$ à 1 c. c. tuent presque toujours l'animal en vingt-huit à soixante-dix-huit heures, le plus souvent en moins de quarante-huit heures. Les moutons qui n'ont pas succombé au bout de trois jours survivent habituellement.

Après quinze heures, en inoculation *sous-cutanée*, il existe un œdème considérable au point d'inoculation ; cet œdème s'étend d'abord en suivant la pesanteur : si on injecte dans la jambe, il descend au pied. Rapidement, le membre injecté devient impotent. L'œdème local est d'abord mou, puis dur ; il n'y a pas de gaz. Vingt-quatre heures après l'injection, il apparaît localement une petite tache violacée qui s'étend graduellement et dont les dimensions finales dépendent de la durée de la maladie ; si la mort survient en quarante heures, cette tache mesure environ 1 centimètre de diamètre. *Autopsie* : au point d'inoculation, la laine se laisse facilement arracher ; l'œdème est considérable, s'étendant du pied jusqu'à laine ; on constate la tache violacée du point d'inoculation. Si la maladie a duré au moins deux jours, les tissus sous-cutanés sont très épais et prennent une apparence nécrotique. Ces tissus sont saturés d'un exsudat clair sans odeur souvent teinté de sang au niveau de l'injection. Cet exsudat atteint parfois la paroi inférieure de l'abdomen, les tissus intermusculaires des muscles abdominaux, rarement les tissus périrénaux. Il n'y a pas de gaz. Les bacilles sont assez abondants au point d'inoculation, mais rares

dans l'excédent sous-cutané; l'ensemencement seul permet souvent de les y déceler.

L'injection *intramusculaire* donne une réaction plus marquée du membre inoculé. Les muscles sont alors foncés et prennent une teinte hémorragique. A leur incision, il se dégage une odeur désagréable qui n'est pas absolument celle de la putréfaction. Les muscles semblent infiltrés comme après une hémorragie. Il n'y a pas de gaz.

Il n'existe pas habituellement de liquide dans les cavités péritonéale et pleurale; mais il peut y en avoir. Au contraire, c'est presque sans exception qu'un liquide clair, citrin, inodore, spontanément coagulable, distend le sac péricardique. Ce liquide est stérile. Le sang et les organes examinés immédiatement après la mort sont stériles. Le foie, le rein, la rate sont congestionnés mais non hypertrophiés. Parfois, à la surface du foie, se trouvent des taches d'aspect sale, de couleur blanchâtre, taches de nécrose au début. Les muqueuses stomacale (caillette) et intestinale sont plus ou moins congestionnées. Les ganglions lymphatiques sont hypertrophiés. Les poumons sont normaux.

C. RECHERCHES D'ALBISTON. — H. Albiston, le collègue de l'un de nous à l'Institut de recherches vétérinaires de Melbourne, étudie depuis plusieurs années l'hépatite infectieuse des moutons de Victoria. Dès 1921, il a isolé à plusieurs reprises, et en cultures pures, un microbe anaérobiose dont nous décrirons plus loin tous les caractères. Il s'est placé dans les meilleures conditions possibles pour pratiquer ses recherches bactériologiques, tenant compte seulement des résultats obtenus après l'autopsie d'animaux dont il avait pu suivre la dernière phase de la maladie, et prélever les divers produits pathologiques immédiatement après la mort. Ce dernier point est important. En effet, la toison du mouton conserve au cadavre pendant assez longtemps une température propice au développement de nombreux germes qui viennent compliquer les recherches bactériologiques éventuelles. Ensemencant successivement les divers organes et liquides pathologiques, sang compris, cet auteur ne trouva jamais que ce bacille, et seulement dans les foyers nécrotiques du foie des moutons.

H. Albiston n'ayant pu faire une étude complète du microbe isolé par lui, a bien voulu le confier à l'un de nous; nous avons poursuivi à l'Institut Pasteur, dans le laboratoire de M. Weinberg, l'identification complète de ce germe.

D. RECHERCHES PERSONNELLES. — *Morphologie.* — Le microbe étudié se présente sous la forme d'un bacille aux bouts arrondis. Après coloration par la méthode de Gram, sa longueur est de $3 \mu 3$ à $14 \mu 5$, sa largeur de $0 \mu 85$ à $1 \mu 1$. On peut voir dans une même culture des formes longues et d'autres plus petites. Les éléments sont isolés ou forment de courtes chaînettes de deux à trois bacilles placés bout à bout. En bouillon au sérum de mouton, nous avons observé des chaînettes de six à huit éléments. Ce microbe est tantôt droit, tantôt régulièrement incurvé. Les formes d'involution, formes filamenteuses, formes granuleuses, apparaissent rapidement dans les différents milieux; les formes filamenteuses sont plus fréquentes dans la bouillie de foie; les formes granuleuses dans le bouillon glucosé. Le protoplasma microbien perd rapidement son homogénéité, et présente des granulations qui se colorent électivement.

Mobilité. — Nous n'avons jamais pu constater de mobilité, ni dans l'organisme animal, ni dans les milieux de culture. Nous l'avons cependant recherchée à tous les stades du développement du bacille, dans les cultures très jeunes comme dans les cultures âgées; nous avons utilisé sans succès la méthode des tubes capillaires. Cependant ce microbe est certainement mobile, il est cilié; ses cils sont périthriches, à peu près de même longueur que le corps bacillaire; ils sont flexueux, possédant de quatre à six ondulations.

Spores. — Les spores sont subterminales, ovalaires, en raquettes; elles sont habituellement volumineuses; leurs dimensions varient de $1 \mu 2$ à $1 \mu 37$ de largeur sur $2 \mu 2$ à $3 \mu 17$ de longueur. Elles se détachent tardivement. Elles se forment rapidement dans le milieu à la bouillie de foie peptonée à 2 p. 100. Elles apparaissent en abondance dans ce milieu vingt-quatre heures déjà après l'ensemencement. Elles sont plus rares et apparaissent plus tardivement en bouillon glucosé (une semaine et plus). Nous ne les avons pas constatées

dans les milieux de culture : bouillon de foie, bouillon simple, bouillon acide, gélose profonde, bouillon au rouge neutre, lait et gélatine. Les spores adultes (culture en bouillie de foie de trente jours) résistent dix minutes à l'ébullition, mais sont détruites après quinze minutes.

Coloration. — Ce bacille reste coloré par la méthode de Gram. Toutefois, dès dix-huit à vingt-quatre heures, on constate déjà la présence de nombreuses formes qui se décolorent

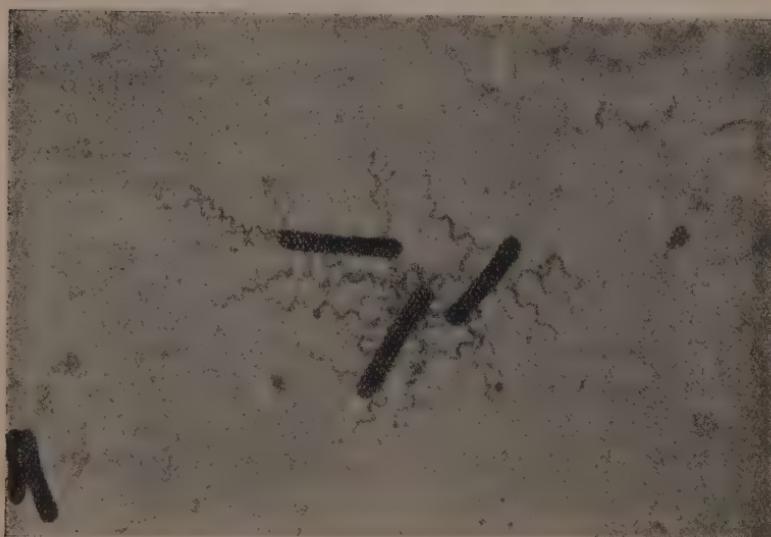


FIG. 1. — Culture de vingt-quatre heures en bouillie de foie; formes ciliées (grossissement 1.800), coloration par la solution de Fontana.

par cette méthode. Les microbes présentent souvent des bandes transversales, au nombre de deux à trois, qui conservent la coloration. Par la simple coloration au moyen de la fuchsine de Ziehl, à froid, ces bandes se trouvent de même beaucoup plus colorées que le reste du corps bacillaire. La fuchsine phéniquée à froid colore faiblement les spores adultes; elles sont plus nettes après coloration par la méthode de Moeller.

Nous avons éprouvé beaucoup de difficulté à colorer les cils; en effet, le bacille ne présente ses caractères typiques que dans

la bouillie de foie, et ce milieu forme avec les colorants beaucoup de précipités. Nous y sommes parvenus en utilisant la technique suivante inspirée par celle d'Inouye pour la coloration du bacille *proteus* (1924) : on prélève avec une pipette Pasteur un peu de culture en bouillie de foie; on aspire pour faire monter la colonne de liquide dans la pipette après l'avoir enlevée du milieu; puis on chauffe l'extrémité intérieure de



FIG. 2. — Culture de vingt-quatre heures en bouillie de foie; éléments droits, à bouts arrondis; éléments incurvés; formes sporulées (spores subterminales) [grossissement 1.800]. Ces clichés sont dus à l'obligeance de notre collègue M. Jeantet, à qui nous adressons nos cordiaux remerciements.

la pipette, au-dessous du liquide, sur la flamme de la veilleuse, et on l'étire brusquement avec une pince, pour avoir une effilure qui permettra de faire de très petites gouttelettes. Sur des lames rigoureusement propres, on dépose ces petites gouttelettes, et on exécute les opérations suivantes :

a) Fixer par les vapeurs d'acide osmique avant que la préparation n'ait eu le temps de sécher; puis laisser sécher, soit à l'étuve, soit à la température du laboratoire.

b) Couvrir la lame d'alcool à 96°; laisser en contact deux minutes..

c) Laver doucement à l'eau distillée.

d) Couvrir d'encre de Loeffler; laisser agir à froid pendant trois à quatre minutes, puis chauffer doucement sur la flamme de la veilleuse jusqu'à dégagement de vapeurs; laisser refroidir; laver longtemps à l'eau distillée; répéter trois fois la même opération; il n'est plus nécessaire de laisser agir à froid. Même après les manœuvres précédentes, la préparation est encore très sale; il y a beaucoup de précipité. Pour nous en débarrasser, nous avons adopté l'artifice suivant.

e) Verser quelques gouttes d'alcool acidulé (alcool absolu additionné de 1 p. 100 d'acide chlorhydrique pur) jusqu'à décoloration de la préparation.

f) Laver à l'eau distillée.

g) 1^o Couvrir de la solution de Fontana (azotate d'argent ammoniacal); laisser agir quelques minutes jusqu'à ce que la préparation devienne brûnâtre; laver à l'eau distillée; laisser sécher; monter dans le baume la préparation qui se décoloré au contact de l'huile de cèdre.

2^o On peut suivre la méthode d'Inouye en utilisant le colorant de Muir (solution alcoolique saturée de violet de gentiane 5 cent. cubes + solution aqueuse saturé d'alun de potasse 25 cent. cubes) filtré avant l'emploi. Dans ce cas, chauffer doucement jusqu'à dégagement de vapeurs; laver à l'eau distillée; laisser sécher.

Caractères culturaux. — Nous avons eu de grandes difficultés à acclimater ce bacille aux différents milieux employés dans le laboratoire. La souche originale de H. Albiston, conservée en bouillie de foie, n'avait rien perdu de son pouvoir pathogène, mais il nous a été impossible de l'ensemencer d'emblée dans les différents milieux de culture nécessaires à son étude complète. Ce n'est qu'après de nombreux passages par la bouillie de foie, milieu recommandé par Albiston, que nous sommes arrivés à ce résultat. Pour l'étude des différents caractères culturaux, nous avons suivi le procédé employé au laboratoire de M. Weinberg, et nous avons fait nos divers ensements en partant d'une colonie microbienne unique dans un tube de gélose profonde nitratée et glucosée.

La bouillie de foie de mouton peptonée à 2 p. 100 (1) con-

(1) La formule de préparation de ce milieu a été ainsi donnée par Albiston.

On chauffe à 100°, pendant une heure, un mélange à parties égales d'eau de robinet et de foie de mouton haché. On obtient ainsi trois couches : l'inférieure est constituée par les morceaux de foie; la moyenne est liquide; enfin, à la surface, surnagent des albumines coagulées. On enlève à la spatule la couche surnageante. On filtre ensuite sur filtre humide la partie liquide à laquelle on ajoute 2 p. 100 de peptone et 1/2 p. 100 de sel marin. On neutralise. On la chauffe à 120° à l'autoclave pendant 15 minutes pour précipiter les sels alcalins-terreux.

On lave à grande eau la bouillie de foie que l'on répartit ensuite dans les tubes jusqu'à la moitié de la hauteur définitive du milieu. On ajoute alors la quantité nécessaire de partie liquide de bouillon de foie. On stérilise les tubes à 120° pendant un quart d'heure.

vient particulièrement au bacille qui y pousse très bien. Le milieu se trouble uniformément au bout de huit à dix heures. Puis, les microbes s'agglomèrent, et tombent en flocons à la surface de la bouillie; le liquide surnageant s'éclaircit en dix-huit à vingt-quatre heures. Il y a production de gaz parfois si abondante, surtout dans les milieux ensemencés à la sortie de l'autoclave, que la masse de la bouillie est comme éclatée. *Bouillon de foie digéré* (digestion peptique) : la culture est un peu moins abondante que dans le milieu précédent; mais elle présente les mêmes caractères : trouble du milieu, puis agglutination des microbes en flocons, dépôt au fond du tube, et éclaircissement du liquide en vingt-quatre à trente-six heures.

Cette auto-agglutination des microbes avec dépôt floconneux se manifeste dans tous les milieux liquides. *Bouillon glucosé* : après acclimatation, le bacille s'y développe abondamment en produisant des gaz; le dépôt peut être particulièrement important et atteindre la moitié de la hauteur du liquide. Toutefois, une culture riche n'a pu être repiquée avec succès après quinze jours; après ce laps de temps, elle ne contenait plus que des formes granuleuses, déformées, complètement involuées. *En bouillon simple*, la culture est moins abondante qu'en bouillon glucosé : il n'y a pas de gaz. Nous n'avons pu cultiver ce germe dans l'eau *peptonée* non sucrée. *En bouillon bilié*, la culture est riche; mais l'auto-agglutination est moins rapide que dans les autres milieux. *En bile pure*, la culture est pauvre; le bacille, en *bouillon acide*, ne pousse plus à la deuxième génération. Dans *les bouillons au sérum*, le microbe se développe très abondamment; il donne avec le *sérum de mouton* une culture plus riche qu'avec le *sérum de cheval*. *En gélose profonde*, la forme des colonies est variable. Dans le même tube, nous avons vu des colonies lenticulaires, des colonies bourgeonnantes et des colonies filamentueuses qui ont donné des cultures identiques après repiquage en bouillon glucosé. Il n'est pas rare de voir des colonies en grenade. Il y a formation de gaz qui font parfois éclater la gélose dans les cultures largement ensemencées. L'apparition des colonies est plus ou moins tardive (de vingt heures à trois et quatre jours).

La zone d'aérobiose est d'environ 1 centimètre. La souche en bouillie de foie d'Albiston n'a pas poussé d'emblée en gélose

profonde. Les premières colonies que nous avons obtenues dans ce milieu provenaient de l'ensemencement de la sérosité oëdémateuse d'un cobaye qui avait succombé à l'injection de bouillie de foie.

Dans le *lait*, le bacille pousse pauvrement sans coagulation ni digestion après un mois d'étuve. La *gélantine glucosée* à 1 et 2 p. 100 est liquéfiée après quinze jours d'étuve à 37°; la *gélantine non glucosée* n'est pas liquéfiée; après un mois de séjour à l'étuve, le cube d'*albumine d'œuf* n'est pas attaqué. Le *bouillon au rouge neutre* vire très lentement et très incomplètement après plus d'un mois, malgré une culture abondante.

Pouvoir saccharolytique (étudié dans l'eau peptonée additionnée du glucide). — Ce microbe attaque en vingt-quatre heures glucose, lévulose, lactose, saccharose, et en trois jours galactose. Il n'attaque pas maltose, dulcite, mannite, glycérine, inuline.

Pouvoir pathogène — Nous avons étudié le pouvoir pathogène de ce bacille sur le cobaye et sur la souris.

Chez le *cobaye*, l'inoculation *intramusculaire* ou *sous-cutanée* de 1/10 de centimètre cube de culture de vingt-quatre heures en bouillie de foie provoque la mort de l'animal en seize à vingt-quatre heures. En injection sous-cutanée, l'oëdème au point d'inoculation est légèrement rosé. Cette teinte rosée est beaucoup plus marquée quand l'injection est intramusculaire; dans ce cas, on peut même voir à ce niveau quelques bulles de gaz. Il n'y a pas d'odeur putride. L'oëdème sous-cutané, qui existe même quand l'injection a été pratiquée par voie intramusculaire, est gélatinieux, épais parfois de plus de 1 centimètre; il s'étend jusqu'aux aisselles, et dans certains cas envahit même le cou et le menton. Il est rare d'y trouver des bacilles, tant à l'examen direct qu'après coloration. On ne les trouve qu'au point d'inoculation.

La cavité péritonéale contient souvent une petite quantité de sérosité claire; l'estomac, les intestins et la rate sont inconsidérablement congestionnés. Par contre, les reins, les capsules surrénales et le foie présentent habituellement une congestion marquée; il existe parfois des taches nécrotiques sous-capsulaire du foie; ces taches sont stériles. On constate souvent un petit épanchement pleural; l'épanchement péricardique manque souvent et n'est jamais très important. Les poumons ne pré-

sentent aucune altération. Le bacille n'est retrouvé qu'au point d'inoculation, dans la sérosité sous-cutanée et musculaire.

Pendant nos expériences, à la suite de nombreux passages en gélose profonde, la souche microbienne perdit peu à peu beaucoup de son pouvoir toxique. La dose de 1/4 de centimètre cube s'est montrée encore suffisante pour tuer le cobaye en moins de vingt-quatre heures. Dans ces cas, l'apparence de l'œdème était différente; au lieu d'être clair, il était légèrement troublé et plus hémorragique surtout après injection intramusculaire. L'exsudat péritonéal était plus abondant; il n'y avait pas de taches nécrotiques du foie. Contrairement à ce qui s'était passé avec la souche encore très toxique, on trouvait une grande quantité de bacilles typiques dans toute l'étendue de l'œdème, dans le liquide péritonéal et même dans le sang du cœur.

Souris. — La souris est également sensible au bacille. Elle meurt rapidement, seize à dix-huit heures après l'injection de 1/20 à 1/50 de culture totale. Les lésions sont les mêmes que chez le cobaye; cependant, nous n'avons jamais constaté de taches nécrotiques du foie, et la rate, toujours très congestionnée, peut s'hypertrophier jusqu'à cinq fois son volume normal.

Toxine. — La culture en bouillie de foie filtrée après dix-neuf à vingt heures sur bougie L² donne une toxine qui tue la souris à la dose de 1/200 de centimètre cube. Elle provoque de forts œdèmes non hémorragiques qui se résorbent, à la dose de 1/1.000 et de 1/2.000 de centimètre cube. Toutefois la toxicité des filtrats est variable, sous des conditions que nous n'avons pu déterminer.

Cette toxine est fortement hémolytique : 1 cent. cube titre 40 unités hémolytiques de Weinberg, c'est-à-dire que 0 c. c. 1 de cette culture hémolyse 0 c. c. 4 de globules rouges de mouton au 1/20. La toxine a été détruite totalement par le chauffage à 60° pendant une heure; l'hémolysine n'a été détruite qu'incomplètement dans les mêmes conditions.

NEUTRALISATION PAR LE SÉRUM ANTI-ŒDEMATIENS.

Le sérum anti-œdematiens typique préparé avec la souche du laboratoire a neutralisé intégralement le pouvoir pathogène

du bacille isolé par Albiston, aussi bien son pouvoir toxique que son pouvoir infectieux.

La morphologie, les caractères culturaux, malgré quelques différences dans les propriétés fermentatives et l'inaptitude à former des spores en bouillon glucosé, le pouvoir pathogène, les lésions anatomo-pathologiques provoquées, et la neutralisation intégrale par le sérum *anti-oëdematiens*, nous autorisent à affirmer que le microbe isolé par Albiston des foyers nécrotiques du foie de moutons atteints de *Braxy* est une race de *B. oëdematiens*. Ce fait est d'autant plus intéressant que H. Albiston a isolé plusieurs fois ce microbe dans la même maladie du mouton.

Ajoutons, enfin, que le microbe que nous venons d'étudier représente une race-spéciale adaptée à l'organisme du mouton, puisqu'elle pousse beaucoup mieux dans les milieux additionnés de sérum de mouton.

Au point de vue bactériologique, les renseignements donnés par Gilruth sur le bacille qu'il a trouvé sont tout à fait insuffisants pour permettre son identification.

Le bacille isolé par Dodd provoque chez l'animal des lésions presque identiques à celles causées par le bacille que nous avons identifié; son aspect microscopique est semblable; Dodd n'a pas décrit de cils. Cet auteur n'a pas étudié son microbe dans tous les milieux où nous avons ensemencé celui d'Albiston. Les caractères culturaux qu'il a donnés sont semblables en ce qui concerne l'auto-agglutination rapide des germes sous forme de flocons. Ils diffèrent dans l'action sur le lait, que le bacille de Dodd digère complètement en deux jours, en donnant une odeur désagréable. Cette action sur le lait et cette odeur dégagée sont des différences trop marquées avec le *B. oëdematiens* type et le *B. oëdematiens* souche Albiston, pour penser qu'il s'agit de la même espèce microbienne. Cependant, l'ensemble de ses caractères rappelle beaucoup le *B. oëdematiens*. S'il ne s'agit pas d'un microbe nouveau, on est obligé de penser que les cultures de Dodd contenaient probablement du *B. oëdematiens*, mais n'étaient pas pures.

Le *B. oëdematiens* joue donc un rôle pathogène important dans le *Braxy* des moutons australiens. Toutefois, jusqu'à présent, il n'a pu reproduire seul tous les caractères de l'affec-

tion, en particulier l'infection nécrotique localisée du foie. Il reste donc à réaliser expérimentalement, par le microbe isolé, la maladie observée chez le mouton, et à préparer le vaccin qui permettra de lutter contre cette épidémie (1).

BIBLIOGRAPHIE

- H. ALBISTON, Report to the Trustees of the Walter and Eliza Hall Fellowship, Sydney, 1921; Infections necrotic hepatitis of sheep in Victoria-A Braxy-like sheep disease. *Australian Journal of experimental Biology and Medical Science*, 4, 1927, p. 113-123.
- S. DODD, Studies in Black-Disease. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 31, 1918, p. 1-35; The Etiology of Black-Disease. *Id.*, 34, 1921, p. 1-26.
- G. A. GILRUTH, A Disease of Sheep in Tasmania. *Veterinary Journal*, 1, 1910; The Braxy Type of Sheep Disease in Australia. *Proceedings of the Australian Association of the Advancement of Science*, Sydney, 1911.
- V. INOUYE, A new method of staining flagella and observations on the morphological changes in flagella, depending on age of bacteria. *Scientific Reports from the Government Institute for Infectious Diseases; Tokyo Imperial University*, 3, 1924, p. 11.
- POTTIE, in Dodd, 1918.
- STEWART, in Dodd, 1918.
- TURNER et DAVESNE, Bacille cœdématisans et Braxy des moutons de Victoria (Australie). *C. R. de la Soc. de Biol.*, Paris, 26 mars 1927.

(1) Depuis la rédaction de ce mémoire, l'un de nous (Turner) a constaté, chez le cobaye, en utilisant une souche virulente, la présence de foyers nécrotiques du foie.

AU SUJET DU SÉRO-DIAGNOSTIC DU CANCER LES PHÉNOMÈNES DE PRÉCIPITATION

par Ch. MONDAIN, R. DOURIS et J. BECK.

INTRODUCTION.

L'attention du public et des milieux scientifiques est depuis longtemps fixée sur la grande fréquence des affections cancéreuses. Aujourd'hui, il est établi que seul le diagnostic précoce permet d'intervenir efficacement. D'où le nombre considérable des travaux sur ce problème. Nous nous sommes préoccupés d'étudier le mécanisme de quelques-unes des séro-réactions proposées, dans le but de mettre en évidence les particularités des sérum cancéreux et d'en tirer profit en vue de l'établissement de méthode plus précise.

Dans une publication antérieure, nous avons étudié le mécanisme de la réaction Thomas-Binetti (1). Nous avons pu montrer que le phénomène de réduction du bleu de méthylène attribué par les auteurs au sérum cancéreux était dû, en réalité, à l'action des microbes apportés par l'extrait servant de réactif.

Aujourd'hui, nous abordons l'étude de la réaction de Botelho.

La réaction initiale a subi plusieurs modifications. Il existe notamment : une citro-réaction, avec l'acide citrique, deux azoto-réactions (A. Z. R. 1 et A. Z. R. 2) et une ammo-réaction où l'on fait intervenir l'ammoniaque. Récemment on a introduit une correction réfractométrique des sérum à examiner et ici on distingue l'auto-correction et l'hétéro-correction.

TECHNIQUE DE LA MÉTHODE AVEC AUTO-CORRECTION.

Nous avons effectué nos recherches par la méthode dénommée A. Z. R. 2 à laquelle Botelho donne la préférence. Cette méthode exige les réactifs suivants :

(1) Ch. MONDAIN, R. DOURIS et J. BECK. Ces *Annales*, 40, 1926, p. 431.

RÉACTIFS.

1^o Réactif iodo-ioduré:

Iode, en gramme	1
Iodure de potassium, en grammes	2
Eau distillée, en centimètres cubes	210

2^o Acide azotique à 1. p. 100 dans l'eau distillée.

MODE OPÉRATOIRE.

Dans un tube à essai de 12 centimètres de haut sur 1 centimètre de diamètre (1) on verse 3 centimètres de réactif azotique. On y ajoute ensuite 0 c. c. 5 de sérum à examiner, on mélange le tout en retournant le tube sur le doigt qui le bouche et on agite. Il se forme une légère mousse à la surface du mélange. C'est sur cette mousse qu'il faut verser lentement 0 c. c. 5 de réactif iodé. Au point de contact du réactif iodé et du mélange sérum-réactif acide se forme un petit précipité. On bouche le tube avec le doigt et on secoue de haut en bas par petites saccades; le précipité gagne peu à peu le fond du tube et se dissout. Alors seulement on retourne le tube sur lui-même.

On répète la même manœuvre avec des additions successives de 0 c. c. 5 puis de 0 c. c. 3 de réactif iodé.

Un précipité persistant après ces trois additions de réactif (soit 1 c. c. 3) caractériserait d'après Botelho un sérum cancéreux.

Pour faciliter l'exposé de la technique avec tous ses détails, nous avons indiqué une dose fixe du sérum 0 c. c. 5. En réalité, cette quantité dépend de la proportion d'albumines totales sériques. Pour en tenir compte, cette dernière est évaluée rapidement par la détermination de l'index réfractométrique. La quantité à introduire est donnée par la formule.

$$Q = \frac{40}{I} \text{ ou } I \text{ signifie l'équivalent (2) en albumine de l'index}$$

(1) Cette dimension est recommandée par les auteurs, car un tube trop large tend à négativer la réaction et inversement un tube à calibre trop étroit tend à la positiver; BEATRIX TEDESCO POLOCK, séro-diagnostic du cancer, p. 34, Paris. Les Presses universitaires de France.

(2) L'équivalent en albumine de l'index réfractométrique est donné par les tables de Reiss.

réfractométrique. La quantité 0 c. c. 5 correspond justement à un sérum qui contiendrait 80 grammes d'albumines totales par litre.

MÉCANISME DE LA RÉACTION.

Tous les auteurs, qui se sont préoccupés du mécanisme de cette réaction, envisagent cette dernière comme étant le résultat d'une précipitation des matières albuminoïdes en milieu acide. Le milieu acide est nécessaire car si on substitue à l'acide un sel, le chlorure de sodium, par exemple, cette précipitation ne se produit pas. Cependant, l'explication de la réaction demande une étude plus approfondie.

PRÉCIPITATION SOLUBLE DANS UN EXCÈS.

Si l'on examine la technique suivie pour la réaction, on y retrouve un phénomène général sur lequel l'un de nous (1) a attiré l'attention dans plusieurs circonstances, à savoir : *lorsqu'au cours d'une réaction biologique, nous avons production d'un précipité dans la composition duquel entrent des matières albuminoïdes, le précipité formé ou le flocculat disparaît sous l'action d'un excès d'un des constituants qui lui ont donné naissance.* Ici, le précipité formé en milieu nitrique par l'iodure de potassium iodé avec les albumines sériques est soluble dans ces dernières et la quantité de précipité dépend essentiellement de la quantité d'albumines sériques en présence. Lorsqu'on a obtenu un précipité permanent, il est facile de s'assurer de sa solubilité dans une certaine quantité d'albumine surajoutée.

Celui qui pratique cette réaction constate au moins à deux reprises ce phénomène de précipitation et de dissolution jusqu'à l'obtention du précipité permanent.

Sans insister sur ce phénomène, certains auteurs Palmieri.(2), Faludi (3) et Botelho lui-même se sont rendu compte de l'influence de la quantité de matières albuminoïdes. Un

(1) R. DOURIS. Guide pratique pour l'analyse du sang, p. 162. Vigot frères, édit., Paris, 1923. — R. DOURIS. *C. R. Soc. biol.*, 46, 1927, p. 107.

(2) PALMIERI. *Le Ressigna di Clinica e Terapia*, 5, 6 juin 1924, d'après GUILLET, *Thèse Dr. Ph.*, p. 63, Paris 1926.

(3) FALUDI. *Biochem. Zeitschr.*, 162, 1925, p. 116.

sérum riche en albumines totales donne, en général, une réaction négative, et un sérum pauvre en albumine donne, au contraire, une réaction positive.

Cette influence des matières albuminoïdes est si grande que certains auteurs ont vu là l'explication de la réaction. C'est ainsi que Kahn (1) a attribué la cause de la réaction positive à la diminution des albumines hydrophiles et depuis a basé sur ce fait une nouvelle réaction sérologique.

La quantité de matières albuminoïdes peut ainsi fausser le résultat de la réaction. D'après Guillerot, 90 p. 100 de réactions positives constatées avec des sérums non cancéreux concernaient des sérums dont la teneur en albumine évaluée au réfractomètre se montrait inférieure à 80 grammes p. 1.000.

Inversement, 70 p. 100 des fausses réactions négatives portaient sur des sérums cancéreux dont la teneur en albumine était supérieure à 80 grammes p. 1.000.

A la faveur de la loi citée plus haut, il nous est permis de donner l'explication de ces résultats.

Dans le premier cas, la quantité d'albumine est insuffisante pour amener la dissolution du précipité produit par le réactif iodo-ioduré. D'où persistance du précipité et réaction positive.

Dans le deuxième cas, au contraire, l'albumine en excès détermine la dissolution du précipité. Le précipité n'est pas permanent, la réaction est négative.

La teneur en matières albuminoïdes, à elle seule, semble cependant insuffisante pour expliquer la réaction telle qu'elle est décrite avec sa technique définitive (correction réfractométrique) puisqu'on opère en présence de la même quantité de matières albuminoïdes. Botelho a, en effet, songé à déterminer la teneur en albumines des sérums et à les ramener à une teneur normale conventionnelle de 80 p. 100 d'albuminoïdes totales pour faire sa réaction. D'après l'hypothèse précédente, tous les sérums devraient donner le même résultat. Or, il n'en est rien.

(1) KAHN (H.). *Klinisch. Woch.*, 3, n° 20, 20 mai 1924.

**LA FORMATION DU PRÉCIPITÉ N'EST PAS SPÉCIFIQUE
AU RÉACTIF IODO-IODURÉ.**

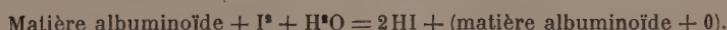
Dans les conditions de la réaction, Pelet (1) a constaté que les polyiodures et les matières colorantes acides ont le même pouvoir précipitant que le réactif iodo-ioduré (par exemple : l'iodure double de cadmium et potassium, les solutions aqueuses de ponceau cristallisé, d'orange G, le jaune naphtol, la satoglucine, etc.). Ces corps présenteraient des caractères physico-chimiques communs : charge électrique négative, etc...

En somme, il s'agit d'une précipitation des albumines totales au moyen d'un réactif quelconque. Nous-mêmes avons pu obtenir des résultats identiques à ceux donnés par Botelho en substituant au réactif iodo-ioduré : le ferrocyanure de potassium, le ferricyanure de potassium, le bichromate de potassium. Les sels suivants : iodure de potassium, bromure de potassium, chlorure de potassium, iodure de sodium, bromure de sodium agissent de même s'ils sont employés à concentration élevée.

ÉTUDE DE LA PRÉCIPITATION PAR LE RÉACTIF IODO-IODURÉ.

Certains auteurs se sont préoccupés du mode d'action du réactif iodé sur les protéines du sérum. D'après Faludi, la précipitation des matières albuminoïdes, plus ou moins riches en eau, dépendrait de la facilité que possède le réactif à les déshydrater. Il en résulterait une sorte de « relargage » et dans cette précipitation l'iode n'aurait qu'un rôle secondaire.

D'un autre côté, nous savons que les protéines sont susceptibles de « dissimuler » une petite quantité d'iode ; celui-ci jouant un rôle d'oxydant indirect suivant la réaction :



Cette absorption d'iode suivant ce processus est faible et se produit aussi bien dans les réactions négatives que dans les réactions positives. Mais, dans ce dernier cas, il s'ajoute à la

(1) PELET. *Thèse de médecine*, Lausanne 1924, d'après GUILLEROT, *Thèse Dr. Pharm.*, Paris, 1926, p. 85.

réaction précédente une action directe de l'iode sur les matières albuminoides qui aboutit à la formation d'un précipité brun. La quantité d'iode libre disparue du réactif est alors toujours proportionnelle à la quantité de ce précipité.

C'est ce que nous ont montré les expériences suivantes qui ont été faites pour étudier les différents constituants du réactif. Pour cela, nous avons préparé des solutions dans lesquelles les proportions d'iode et d'iodure de potassium sont respectées, mais où l'iode a été transformé en acide iodhydrique.

Solutions essayées.

N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	RÉACTIF de Botelho
Iodure de potassium 2 gr.	HI 1 gr.	HI 4 gr.	Iode 1 gr.	Iode 1 gr.
Eau distillée 210 c.c.	Eau 210 c.c.	KI 2 gr. Eau 210 c.c.	HI 1 gr. Eau 210 c.c.	KI 2 gr. Eau 210 c.c.

I. La solution n° 1, d'iodure de K à 2 grammes pour 210 cent. cubes d'eau distillée, employée dans les conditions de la réaction de Botelho, au lieu et place du réactif iodo-ioduré n° 5, ne détermine aucune précipitation.

II. Les solutions n° 2 et n° 3, faites pour examiner l'action de l'acide iodhydrique seul ou en présence d'iodure de potassium, ne déterminent pas de précipitation quelle que soit la dose employée.

III. La solution n° 4, d'iode dissous dans l'acide iodhydrique, a une action analogue à celle du réactif employé par Botelho. Son action précipitante est cependant légèrement plus faible. De plus, dans le réactif de Botelho, faisons varier les proportions d'iode et d'iodure de potassium tout en conservant le même volume de 1 c.c. 3 prescrit. Nous observons que pour une même quantité d'iodure de potassium et des quantités d'iode progressivement croissantes, nous avons une précipitation de plus en plus abondante (toutefois dans des limites comprises entre sol. I n/10 — n/30).

Si, au contraire, pour une quantité d'iode fixe, on fait varier

la proportion d'iodyure de potassium, il faut atteindre des concentrations élevées de ce dernier (10 p. 100) pour observer une légère augmentation du précipité.

De toutes ces expériences, il résulte que l'iode joue un rôle essentiel dans la formation du précipité.

RÔLE DES CONSTITUANTS DU SÉRUM SANGUIN.

On a attribué tout d'abord à un excès d'urée les résultats positifs de la réaction. Cette opinion ne peut plus être maintenue aujourd'hui.

Au contraire, nous avons vu que les matières albuminoïdes jouent le plus grand rôle dans la réaction. Nous avons donné plus haut l'explication de l'influence de la teneur en albumines sur le résultat de la réaction.

L'importance de ce facteur a amené Botelho lui-même à apporter plusieurs modifications ayant pour but d'opérer toujours en présence de la même quantité d'albumines.

Quant aux proportions de globuline et serine, les opinions des différents auteurs sont contradictoires. Fry (1), Faludi nient l'influence du rapport $\frac{\text{serine}}{\text{globuline}}$. Guillerot (2), au contraire, trouve dans ce rapport une partie du mécanisme de la réaction. Cependant, deux sérums de même teneur en albumines totales et en globulines lui ont donné des résultats différents. Guillerot (2) fait ainsi remarquer que d'autres facteurs doivent intervenir dans la réaction.

La modification apportée par la correction réfractométrique permet bien d'opérer toujours en présence d'une même quantité d'albumines, mais cela n'est pas sans inconvénients..

Ainsi dans la technique avec hétéro-corréaction, l'évaporation ou la dilution du sérum exerce une grande influence sur la texture primitive des matières albuminoïdes.

Dans l'autre procédé plus employé dit « avec autocorrection », la quantité de sérum varie selon sa teneur en albuminoïdes. Les sérums ne sont donc plus examinés dans les mêmes condi-

(1) FRY (H. J. B.). *Bulletin du Cancer*, 14, 1925, p. 52.

(2) GUILLEROT. *Thèse Dr. Ph.*, Paris, 1926, p. 67.

tions expérimentales (volume total, pH^+ , concentration en sel, etc...).

Nos expériences, dans le détail desquelles nous ne pouvons entrer ici, nous montrent que le pH^+ et la concentration saline ont une influence sur l'intensité de la réaction. Néanmoins, cette influence est légère et ne suffit pas à elle seule pour expliquer les différents résultats obtenus avec des sérum de même teneur en albumines.

Notons en passant qu'un serum normal additionné d'acide urique (1 gr. 2 par litre de serum) donne une réaction positive.

L'addition de glucose à fortes doses (5 grammes par litre de serum) agit dans le même sens.

L'ion potassium n'intervient aussi comme facteur important que pour des proportions considérables que l'on ne rencontre pas dans l'organisme.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

On a vu plus haut que la présence d'un précipité persistant permet, d'après Botelho, de conclure qu'il s'agit là d'un serum cancéreux. Cependant, des auteurs distinguent trois résultats différents : 1^o la réaction est négative, lorsqu'en regardant une lampe à travers le tube on distingue nettement ses filaments et aucun précipité; 2^o la réaction est sur le « seuil de positivité », si on distingue nettement les filaments de la lampe et quelques flocons persistants; 3^o la réaction est positive, quand le contenu du tube est devenu trouble au point de ne plus pouvoir distinguer les filaments de la lampe.

Au cours de nos expériences, nous n'avons obtenu que très rarement des réactions où le contenu du tube était entièrement trouble. Dans la plupart des cas, les réactions positives présentaient une flocculation plus ou moins intense.

Pour pouvoir apprécier ces différences dans les quantités de précipité, nous avons eu recours à la centrifugation. On obtient ainsi un dépôt brunâtre et un liquide surnageant, limpide, présentant une coloration brune moins foncée toutefois que la couleur initiale du réactif. Les dépôts obtenus plus ou moins abondants montrent que la manière habituelle d'apprecier le résultat de la réaction manque de précision.

MODIFICATION DE LA MANIÈRE D'APPRÉCIER LES RÉSULTATS
DE LA RÉACTION DE BOTELHO.

SUBSTITUTION D'UNE VALEUR NUMÉRIQUE AU RÉSULTAT QUALITATIF. — Quel que soit le résultat de la réaction de Botelho, réaction négative ou positive, il reste toujours un excès d'iode libre à la fin de la réaction, qu'il y ait ou non précipitation.

Pour remédier à l'inconvénient signalé plus haut, nous avons eu recours à un dosage titrimétrique précis et d'une grande simplicité, ce qui le met à la portée de n'importe quel laboratoire. Nos expériences sur le mécanisme de la précipitation nous ont montré la corrélation étroite existant entre le précipité et l'iode libre. Plus une solution était riche en iode, plus le précipité était abondant et coloré. Dans les réactions de Botelho positives, nous avons constaté que l'intensité de la coloration du liquide surnageant diminuait lorsque le précipité augmentait.

C'est ce qui nous a amené à doser l'iode dans le liquide surnageant. Nous avons ainsi la quantité d'iode en excès et un calcul nous fait connaître l'iode absorbé par le précipité.

TECHNIQUE.

La technique du dosage demande peu de temps. On opère rigoureusement dans les conditions indiquées par Botelho. Nous employons cependant des tubes de même diamètre (1 centimètre) mais d'une hauteur moindre (8 centimètres) afin de pouvoir les placer directement dans une centrifugeuse à grande vitesse.

Dans le tube on introduit 3 cent. cubes d'acide azotique dilué au 1/100 dans de l'eau distillée, on y ajoute ensuite une quantité (Q) de sérum voisine de 0 cent. 5 et calculée d'après la formule :

$$Q = \frac{40}{I}$$

(dans laquelle I signifie l'équivalent en albumine de l'indice refractométrique du sérum obtenu au moyen des tables de Reiss).

Enfin, on verse dans ce mélange 1 cent. cube de réactif iodoioduré de formule :

Iode, en gramme	1
Iodure de potassium, en grammes.2
Eau distillée, en centimètres cubes	210

en trois fractions (0 c. c. 5 + 0 c. c. 5 + 0 c. c. 3) espacées d'une minute.

Après cette addition et agitation prescrite nous centrifugeons pendant cinq minutes (3.000 tours à la minute). Le précipité se rassemble en un culot très compact. L'adhérence du précipité au fond du tube est telle qu'elle permet non seulement la décantation du liquide surnageant, mais même un lavage du tube avec 10 cent. cubes d'eau distillée, employée en deux fois, sans entraîner de précipité.

Les liquides de décantation et de lavage sont réunis dans un vase de Bohème (1). On y titre l'iode en ajoutant goutte à goutte de la solution *n*/20 d'hyposulfite de soude jusqu'à décoloration. (L'empois d'amidon comme indicateur ne présente aucun avantage.) Soit *N* le nombre de centimètres cubes de solution titrée d'hyposulfite de soude employée.

CALCUL.

Le calcul nécessite le titrage préalable du réactif iodo-ioduré employé avec la solution *n*/20 d'hyposulfite de soude.

1 cent. cube d'hyposulfite de soude *n*/20 correspondra, par exemple, à 1 c. c. 025 de réactif iodo-ioduré. D'autre part, *N* exprime la quantité d'hyposulfite de soude utilisée dans la technique. Nous avons ainsi :

Quantité d'iode retrouvée dans le liquide surnageant le précipité (exprimée en centimètre cube de réactif iodo-ioduré employé). $N \times 1,025$

QUANTITÉ	QUANTITÉ
du réactif	d'iode
introduit	retrouvée

Quantité d'iode absorbée par le précipité (exprimée en centimètre cube de réactif iodo-ioduré) $1,3 - N \times 1,022 = T_p$.

(1) La quantité de sérum employée étant variable, selon l'index réfractométrique du sérum, nous oblige à employer la technique ci-dessus plutôt que de prendre une partie aliquote, façon d'opérer plus commode et plus précise qui pourrait être appliquée à la première réaction de Botelho dans laquelle on emploie la quantité fixe de 0 c.c. 5 de sérum.

Ce dernier chiffre ou taux de précipitation T_p peut ainsi caractériser l'intensité de la réaction.

RÉSULTATS.

Voici d'après nos expériences les valeurs du taux de précipitation qui peuvent être substituées aux résultats qualitatifs habituels.

Réaction négative, c'est-à-dire sans précipitation . . . $T_p = 0$ jusqu'à 0,15 (1)
 Réaction « sur le seuil de positivité » $T_p = 0,15$ jusqu'à 0,30.
 Réaction positive $T_p > 0,30$.

CONCLUSIONS.

1^o La réaction de Botelho est tout simplement une précipitation des matières albuminoïdes du sérum en milieu acide par un réactif précipitant non spécifique.

2^o La formation du précipité dépend de la quantité des matières albuminoïdes (excès = dissolution, insuffisance = précipitation). C'est là encore une observation dont la généralité tend à en faire une loi biologique, à savoir : *la production ou la dissolution d'un précipité formé avec des matières albuminoïdes dépend essentiellement de la proportion des constituants.*

La correction réfractométrique élimine une cause d'erreur, mais modifie les conditions expérimentales qui ne sont plus rigoureusement identiques pour tous les sérums.

3^o Cette réaction ne peut pas être considérée comme spécifique des affections cancéreuses. Toutefois, pour la rendre plus intéressante, nous avons proposé une technique qui permet de chiffrer les différents résultats obtenus.

Dans le cas de résultats positifs, on a toute une série de valeurs du taux de précipitation qui peuvent présenter un intérêt, soit pour la surveillance du traitement, soit pour suivre l'évolution de la maladie.

(*Travail des laboratoires de l'hôpital Léopold Bellan.*)

(1) On voit que, même dans le cas d'une réaction négative, il y a une petite quantité d'iode libre disparue. Cette dissimulation de l'iode peut s'expliquer par l'action oxydante citée plus haut.

**DU ROLE DE LA PEAU
DANS LA PRODUCTION DES ANTICORPS,
DE L'ANAPHYLAXIE ET DE L'ANTIANAPHYLAXIE**

par E. KLUKHINE (Moscou).

Les excellents résultats que l'on obtient par l'application du principe d'immunisation locale de Besredka à la vaccinothérapie — surtout dans les domaines de la chirurgie, de l'oculistique et de l'obstétrique — incitent naturellement à se poser la question de savoir si la méthode cutanée ne serait pas applicable également à la pratique de la sérothérapie. Cette dernière, lorsqu'elle est pratiquée selon les procédés classiques, n'est pas sans présenter parfois des accidents d'ordre anaphylactique, souvent pénibles. Et l'on serait volontiers enclin à supposer que par la méthode de Besredka, c'est-à-dire par l'application *cutanée* de l'agent thérapeutique, on serait à même d'atténuer ou de supprimer la cause présumée des accidents auaphylactiques. Théoriquement, ces accidents s'expliquent, d'après la théorie de Besredka, par la pénétration rapide d'une grande masse de protéines hétérogènes dans l'économie. La méthode des injections subintrantes de Besredka permet, on le sait, une pénétration lente et progressive de ces protéines.

Les expériences de Golovanoff, faites sur des cobayes, démontrent la possibilité de créer, dans certaines conditions, une sensibilisation anaphylactique, alors même que des albumines étrangères pénètrent par la voie cutanée. Il s'agit de déterminer la nature et le caractère de ces conditions. C'est ce que nous nous proposâmes de faire dans le présent travail. Nous avions à répondre à deux questions :

1° Quelles sont les conditions requises pour que des protéines hétérogènes, appliquées simplement sur la peau, puissent pénétrer dans l'économie?

2° Dans quelles conditions une telle pénétration des pro-

téines par voie cutanée — qu'il s'agisse de l'injection préparante ou déchaînante — serait-elle capable de donner lieu au choc anaphylactique?

Voici quelle fut notre manière d'opérer en ce qui concerne la première série d'expériences. Des cobayes, rasés soigneusement sur la peau du ventre, étaient divisés en deux lots. Les individus du premier lot ont été frottés, au niveau du territoire rasé, avec des globules rouges de mouton; les individus du second lot ont reçu sur le territoire rasé une compresse imbibée d'une pommade lanolinée contenant des bacilles d'Eberth tués.

Ces expériences ont montré que pour la pénétration, dans la circulation générale, des antigènes appliqués sur la peau rasée, l'intensité et la rapidité de cette pénétration sont fonctions des altérations subies par l'épiderme au niveau de l'application de ces antigènes. Si le rasoir n'a fait qu'enlever les poils, sans provoquer d'hyperémie notable, la pénétration des antigènes dans la circulation générale est apparemment nulle ou s'effectue avec une lenteur extrême; aucun procédé sérologique n'est capable de révéler leur présence dans le sang.

Lorsque l'épiderme est moyennement altéré au niveau de la région rasée, lorsque le rasoir y provoque une certaine hyperémie passagère, suivie, le lendemain, d'une desquamation furfuracée, il y a pénétration des antigènes dans le sang, mais assez lente. Enfin, dans les cas où l'épiderme présente des altérations accusées, avec phénomènes d'hyperémie et apparition d'une escarre se formant le lendemain et tombant deux jours après, on constate une pénétration rapide et intense des antigènes dans la circulation générale.

A titre d'exemple, nous rapportons ici plusieurs expériences.

COBAYE N° 3. POIDS : 250 GRAMMES.

Le 11 août 1926, la peau du ventre est bien rasée (légère altération de l'épiderme); on y applique, en frottant, 2 cent. cubes de globules rouges de mouton. Le 16 août, pas d'hémolysines dans le sérum du cobaye. On recommence l'expérience le 17 août; on recherche de nouveau, le 24 août, la présence d'hémolysines dans le sérum : résultat toujours négatif. Des constatations analogues ont été faites chez les cobayes n°s 11 et 27.

COBAYE N° 14. POIDS : 260 GRAMMES.

Le 11 août 1926, la peau du ventre est soigneusement rasée (altération épidermique moyenne); on y applique, en frottant, 2 cent. cubes de globules

rouges de mouton. Le 16 août, on cherche, sans résultat d'ailleurs, la présence d'hémolysines dans le sérum. On recommence l'expérience le lendemain; le 24 août, on constate que le sérum du cobaye hémolyse les globules de mouton à 1 p. 10. Des constatations analogues ont été faites chez les cobayes n°s 26 et 30.

COBAYE N° 10. PÈSE 240 GRAMMES.

Le 28 septembre 1926, on rase la peau du ventre de façon à provoquer un degré moyen d'altérations épidermiques. On y applique un pansement avec de la pommade lanolinée, contenant une culture de bacilles typhiques tués (5 cent. cubes). Le 3 octobre, pas d'anticorps dans le sérum. On recommence l'expérience le 4 octobre; le 10 octobre, on constate la présence d'agglutinines dans le sérum (1 : 20). Le 11 octobre, on renouvelle le pansement; le 16 octobre, l'agglutination est obtenue avec le sérum dilué à 1 p. 100. La réaction de fixation est faiblement positive (+). La réaction de précipitation est négative. Des résultats à peu près analogues ont été relevés chez les cobayes n°s 17 et 18.

COBAYE N° 15. POIDS : 220 GRAMMES.

Le 28 septembre 1926, le territoire rasé présente des altérations épidermiques très prononcées. On y applique un pansement avec de la pommade dans laquelle il a été incorporé 5 cent. cubes d'une culture de bacilles d'Eberth tués. Le 3 octobre, la réaction d'agglutination est positive à 1/30. On remet un nouveau pansement le 4 octobre; le 10 octobre, l'agglutination est à 1/200. La réaction de fixation est moyennement positive (++) . Le 11 octobre, troisième application du pansement. Le 16 octobre, l'agglutination est à 1/300; la réaction de fixation est positive (++) ; la réaction de précipitation est négative.

Des résultats à peu près analogues ont été observés chez deux autres cobayes n°s 34 et 36.

Dans la seconde série d'expérience, nous nous proposâmes de sensibiliser les animaux par l'application, sur la peau rasée, d'un pansement imbibé de divers antigènes (sérum de cheval, culture staphylococcique tuée, filtrat d'une culture paratyphique ou staphylococcique). Au cours de ces expériences, la dose « déchaînante » injectée directement dans le sang de l'animal sensibilisé donna le choc avec du sérum de cheval. Dans les autres cas, où nous nous sommes servis de corps de microbes tués ou de filtrats microbiens, nous n'avons jamais pu assister à un véritable choc anaphylactique. Dans les premiers cas (antigène, sérum du cheval), la gravité du choc a toujours été en rapport direct avec le degré plus ou moins prononcé des altérations épidermiques, comme il ressort des expériences suivantes :

DU ROLE DE LA PEAU DANS LA PRODUCTION DES ANTICORPS 1111

COBAYE N° 59d. POIDS : 260 GRAMMES.

Le 8 juillet 1926, sur la peau du ventre rasée (altérations épidermiques moyennement prononcées), on applique, en frottant, 3 cent. cubes de sérum de cheval. Le 30 juillet, c'est-à-dire vingt-trois jours après, on introduit directement dans la veine jugulaire 0 c. c. 5 de sérum du cheval. Trente secondes après, l'animal manifeste des signes d'inquiétude; il a de la dyspnée; une minute après, surviennent des convulsions, puis des phénomènes paraplégiques; l'animal se renverse sur le côté et succombe au bout de cinq minutes. A l'autopsie, on constate des altérations typiques au niveau du poumon et de la séreuse intestinale; le cœur contient du sang liquide. Des phénomènes analogues de choc ont été observés chez les cobayes n°s 1, 4, 32 et 33.

COBAYE N° 9. POIDS : 250 GRAMMES.

Le 9 août 1926, on applique, en frottant, 3 cent. cubes de sérum de cheval sur la peau rasée du ventre (altérations épidermiques légères).

Au bout de seize jours, le 25 août, on introduit directement dans le cœur 0 c. c. 5 de sérum. Une minute après, l'animal commence à se gratter, présente des clignements de paupières et des tremblements. Tout se dissipe dans l'espace de trente minutes. Une réaction analogue a été observée chez les cobayes n°s 2, 6, 57d et 58d.

COBAYE N° 8. POIDS : 270 GRAMMES.

Le 7 août 1926, on frictionne la peau du ventre rasée (altérations épidermiques de moyen degré) avec 3 cent. cubes d'une culture staphylococcique tuée. Le 24 août, injection de 0 c. c. 5 de ce même antigène directement dans le cœur. Une minute et demie après, l'animal manifeste des signes de démangeaison, des clignements de paupières; des matières fécales s'échappent en abondance. L'animal est complètement remis quarante minutes après. Un tableau analogue, après l'injection déchaînante, est observé chez les cobayes n°s 7 et 12.

COBAYE N° 6. POIDS : 250 GRAMMES.

Le 7 août 1926, on applique, en frottant, sur la peau du ventre rasée (altérations épidermiques moyennes), 6 cent. cubes de filtrat (« antivirus ») d'une culture staphylococcique. Le 24 août, on introduit 0 c. c. 5 de même produit dans le cœur de l'animal. La réaction qui s'ensuit est faible : quelques démangeaisons et des clignements de paupières. Tableau analogue chez les cobayes n°s 20 et 21.

COBAYE N° 16. POIDS : 230 GRAMMES.

Le 24 août 1926, nous appliquons sur la peau du ventre rasée (altérations de l'épiderme moyennement prononcées), en frottant, 6 cent. cubes de filtrat d'une culture de bactilles paratyphique A.

Le 22 septembre, c'est-à-dire vingt-huit jours plus tard, nous introduisons dans la veine saphène moyenne, 0 c. c. 5 du même antigène; on observe des tremblements, des démangeaisons survenant une minute après, puis disparaissant au bout de dix minutes. Des constatations analogues ont été faites chez les cobayes n°s 3 et 5.

Dans une troisième série d'expériences, nous avons essayé de créer un choc anaphylactique chez des cobayes en les sensibilisant par la voie sous-cutanée et en les éprouvant ensuite par application du même antigène sur la peau rasée. Le résultat dans ces conditions s'est toujours montré négatif; nous n'avons jamais pu observer un véritable choc anaphylactique..

COBAYE N° 25. POIDS : 260 GRAMMES.

Le 16 octobre 1926, injection sous-cutanée de 1/100 de centimètre cube de sérum de cheval. Le 9 novembre, application sur la peau du ventre rasée fortes altérations de l'épiderme) d'un pansement avec de la pommade contenant 20 cent. cubes de sérum de cheval.

Quinze minutes après, quelques démangeaisons et contractions musculaires, mais aucune trace de véritable choc. Des résultats analogues ont été obtenus chez les cobayes n° 22, 23 et 24, chez lesquels la dose sensibilisante, injectée par voie sous-cutanée, a été respectivement de 1/10, 1/20 et 1/2 cent. cube de sérum de cheval.

COBAYE N° 37. POIDS : 250 GRAMMES.

Le 16 octobre 1926, injection sous-cutanée de 1/100 de centimètre cube de sérum de cheval.

Le 24 novembre, application sur la peau du ventre rasée (altérations épidermiques de moyen degré), d'un pansement avec de la pommade contenant 20 cent. cubes de sérum de cheval. On constate, vingt minutes après, des tremblements, quelques démangeaisons, des clignements de paupières : l'animal émet des urines abondantes. Tout s'est dissipé au bout de deux heures et demie. Des phénomènes analogues furent observés chez les cobayes n° 28 et 29, lesquels avaient été sensibilisés par la voie sous-cutanée avec 1/20 et 1/2 cent. cube de sérum de cheval.

Nous avons voulu nous rendre compte si l'introduction de la dose déchaînante, par simple application de l'antigène sur la peau rasée, ne serait pas capable de désensibiliser l'animal, c'est-à-dire de le mettre en état d'antianaphylaxie. Trois de nos cobayes ayant servi dans nos expériences antérieures n°s 28, 29 et 37, ont reçu directement dans le cœur 0 c. c. 5 de sérum de cheval. Chez tous la réaction s'est traduite seulement par une légère démangeaison et des clignements de paupières ; aucun de ces cobayes ne succomba.

CONCLUSIONS.

1° A la suite des applications cutanées de certains antigènes, les anticorps ne s'élaborent dans le sérum que lorsque l'épi-

derme présente des altérations marquées; on arrive en ce cas à sensibiliser des cobayes vis-à-vis des protéines du sérum de cheval;

2^o Chez les animaux sensibilisés vis-à-vis du sérum de cheval par la voie parentérale on n'arrive pas à provoquer de véritable choc anaphylactique lorsque l'injection déchaînante est faite par la voie cutanée;

3^o Les cobayes sensibilisés se prêtent à la vaccination anti-anaphylactique par le procédé de Besredka, par simple application du sérum sur la peau rasée.

(*Institut Pasteur.*)

LES MICROBES PATHOGÈNES DE *GALLERIA MELLONELLA*

par V. CHORINE.

Dans ses nombreux travaux sur *Galleria mellonella*, M. Metalnikov a signalé plusieurs fois, chez ces insectes, la présence d'épizooties qui causaient d'importants dommages dans les cultures.

L'ensemencement, sur bouillon ou gélose, du sang des chenilles malades ou mortes, a permis à M. Metalnikov d'isoler une série de microbes. Il constata que chaque maladie est généralement provoquée par une association de deux microbes, un bâtonnet et un microcoque, particuliers pour chaque cas (1).

Les microbes, provoquant des épizooties naturelles, sont encore très peu étudiés. Cette question peut avoir cependant une très grande importance pratique pour la lutte contre les insectes nuisibles.

Suivant le conseil du professeur Metalnikov dès le printemps de 1926, j'ai entrepris l'étude des microbes qu'il avait isolés pendant les épizooties de 1919 à 1926. Sur les huit cultures, quatre présentaient des espèces indépendantes.

Comme le professeur Metalnikov l'a déjà signalé (2), les microbes les plus virulents pour le *Galleria mellonella* sont les saprophytes intestinaux du type de l'Anthracoïdes, du Subtilis, du Proteus, du Coli, etc...

Trois de mes cultures se rattachent à ce groupe. La quatrième par laquelle je commence mon exposé, diffère très nettement des microbes énumérés. Le microbe de cette culture se rapproche par ses propriétés de *Bacillus multipediculus flavus*, Zim., de *Bacillus squamosus longus*, Kern., et de *Bacillus viscosus ochraceus*, Freud., tout en se distinguant très nettement de chacun de ces derniers par sa forme, par les propriétés de

(1) *C. R. de l'Acad. des Soc.*, 1922, p. 68.

(2) *Ces Annales*, Paris, 40, p. 767.

ses spores et de sa culture ainsi que par sa virulence pour les chenilles de *Galleria mellonella*.

L'ensemble de ces caractères nous permet de supposer que ce microbe est une espèce nouvelle, que nous proposons de nommer *Bacterium Galleriæ* n° 1.

Ce microbe a été isolé pendant les épizooties de 1922.

Morphologie (fig. 1). — Bâtonnet mince, assez long, nettement rectiligne, aux extrémités arrondies. L'épaisseur est la même



FIG. 1. — *Bacterium Galleriæ* n° 1.

sur toute la longueur du bâtonnet, longueur de 1 à 7 μ ; largeur de 0,25 à 0,35 μ . Immobile.

Formation des spores (fig. 2). — Le microbe forme une seule spore terminale, d'un diamètre beaucoup plus considérable que



FIG. 2 — Formation des spores de *Bacterium Galleriæ* n° 1.

celui du corps de microbe (analogie avec le type de *Bacillus tetani*). La spore, légèrement ovale, est très grande par rapport au corps de la bactérie.

La coloration du microbe par les colorants usuels (Aniline, Ziehl, etc.) est peu intense; Gram négatif.

Cultures. — L'optimum de température est environ 30-35°.
Aérobio.

“*Gélose.* — Vingt-quatre heures après l'ensemencement, il se forme un voile jaune verdâtre, légèrement visqueux. Les colonies isolées ont une forme arrondie et sont plus épaisses au centre qu'à la périphérie.

Bouillon. — Le bouillon ensemencé se trouble considérablement, mais pas uniformément; après trois jours, le trouble est moins marqué, mais plus homogène. Il ne se produit jamais ni voiles ni anneaux. Dans les vieilles cultures, il se forme un dépôt constitué par des spores et par des débris de corps bactérien.

Gélatine. — Le microbe se développe assez rapidement en liquéfiant la gélatine très lentement sur les lignes de piqûre. Il se forme souvent un entonnoir de gélatine liquide, mais la liquéfaction ne va jamais jusqu'au bout. Dans les vieilles cultures, la gélatine liquide brunit.

Lait. — Le lait est coagulé très lentement (au bout de seize-vingt jours). Certaines variétés du *Bacterium Galleriae* n° 1 ne coagulent pas du tout le lait.

Lait tournesolé. — On observe pendant les premiers jours un rougissement du tournesol.

Petit-lait tournesolé. — Vingt-quatre heures après l'ensemencement, on voit un léger rougissement; les jours suivants, il se forme un voile blanc, le liquide se trouble, puis se décolore. Dans les vieilles cultures, le liquide est rose et l'on ne voit pas de voiles.

Sérum coagulé. — Le sérum coagulé est faiblement digéré par le microbe.

Blanc d'œuf. — N'est pas digéré.

Sang. — Le sang additionné au bouillon, est hémolysé en vingt-quatre, trente-six heures; additionné à la gélose, il est totalement hémolysé en quatre-six jours.

Dans les vieilles cultures, on peut trouver quelquefois des traces d'*Indol*.

Le *Bacterium Galleriae* n° 1 réduit les sulfates et dégage H₂S. Un milieu, avec sous-acétate de plomb, noircit au bout de vingt-quatre, quarante-huit heures.

Pomme de terre. — Vingt-quatre à quarante-huit heures

après l'ensemencement, il se forme un voile jaune verdâtre assez viqueux.

Carotte. — Le microbe ne se développe que très faiblement et la culture est à peine visible.

Artichaut. — Le développement est très faible, comme sur la carotte. Pas de verdissement.

Action du microbe sur les sucres. — En se développant sur les différents milieux sucrés, le *Bacterium Galleriae* n° 1 ne forme jamais de gaz. Il fait fermenter le saccharose, le maltose, le glucose; plus faiblement, le galactose et le lactose. Il peut également faire fermenter la glycérine. En présence des sucres



FIG. 3. — *Bacterium Galleriae* n° 2.

Formation des spores
de *Bacterium Galleriae* n° 2.



non fermentescibles, comme le lévulose, et la mannite, le *Bacterium Galleriae* n° 1 provoque une décoloration rapide et le bleuissement plus ou moins intense du tournesol.

Virulence. — Ce microbe est très virulent pour les chenilles de *Galleria mellonella* (en injection dans la cavité générale). Injecté même à doses très fortes, il ne tue ni les cobayes, ni les souris.

CULTURE n° 2 (fig. 3). — Cette culture, obtenue du microbe isolé par M. Metalnikov pendant l'épidémie de 1922, se trouve identique à celle que nous avons obtenue en 1925, et que nous avons décrite (1) sous le nom de *Bacterium Galleriae*. Pour

(1) *C. R. de la Soc. de Biol.*, 95, 19 juin 1926, p. 199.

plus de commodité, nous la désignerons sous le nom de *Bac. Gal.* n° 2. Ce microbe se rapproche beaucoup du *Bacterium Megatherium*, dont il se distingue par l'absence de dégagement de H₂S, par le trouble non homogène du bouillon par l'action sur le petit-lait tournesolé qu'il décolore complètement, par sa taille plus petite, et, enfin, par sa virulence pour les animaux. Les principales propriétés de ce microbe sont signalées dans le tableau.

CULTURE n° 3. — Cette culture, obtenue du microbe isolé en 1923 des chenilles malades, constitue aussi une espèce nou-



FIG. 4. — *Bacterium Galleriae* n° 3.



FIG. 5
Formation des spores
de *Bacterium Galleriae* n° 3.

velle. Les propriétés de ce microbe le rapprochent du *Bacterium subtilis* et du *Bacterium mesentericus*, mais il se distingue de ces derniers par sa spore terminale, ainsi que par son action sur les sucres. Il se distingue aussi du *Bacterium pseudotetani* et de *Bacillus Alvei* par la forme de ses spores très allongées et particulièrement par les caractères de son développement sur un grand nombre de milieux nutritifs. Il est évident que ce microbe représente une espèce nouvelle, pour laquelle nous proposons le nom de *Bacterium Galleriae* n° 3.

Morphologie (fig. 4). — Le *Bacterium Galleriae* n° 3 est un bâtonnet droit et mince à extrémités arrondies, longueur de 1,5 à 3,2 μ ; largeur de 0,4 à 0,5 μ . L'épaisseur du bâtonnet est égale sur toute sa longueur. Il est très mobile.

Il se forme une seule grande spore terminale, dont le diamètre est légèrement supérieur à celui du corps de la bactérie. La spore est très grande, égale à presque la moitié du corps (fig. 5).

Le microbe prend bien tous les colorants usuels; la coloration par la méthode de Gram est positive.

L'optimum de la température pour la culture est de 25° à 30°. Le microbe est anaérobie facultatif.

Sur la gélose, le développement est très caractéristique. Vingt-quatre heures après l'ensemencement, il se produit un voile incolore, semi-transparent et très dur, qui est intimement soudé à la gélose. Sur la surface de ce voile, il se forme un grand nombre de gouttelettes liquides. Les gouttelettes se recouvrent d'une couche de bactéries, et, en séchant, donnent à la culture un aspect plissé, ce qui le distingue aussi du *Bacterium Mesentericus*.

Sur le bouillon, vingt-quatre heures après l'ensemencement, il se forme un voile mince sec et très résistant. Les jours suivants, le voile se soude intimement, devient très plissé et très solide. Si l'on plonge le voile au fond du tube, il se reforme un nouveau voile. Le liquide garde tout le temps sa parfaite limpidité. On n'aperçoit aucun trouble, même pendant les premières heures après l'ensemencement.

Sur la gélatine, le développement est très caractéristique rappelle celui de *Bacillus Anthracis*. Un ou deux jours après l'ensemencement, il se produit un voile à la surface et un grand nombre de ramifications parallèles qui partent du trait de piqûre. Ensuite des ramifications analogues se forment en partant de la surface vers le fond. La gélatine se liquéfie très lentement en commençant par les couches supérieures. La gélatine, d'abord trouble, s'éclairent par la suite. Le voile descend vers la surface de la gélatine, demeurée encore solide.

Le microbe ensemencé sur le lait le coagule incomplètement au septième-huitième jour. Ensuite, il commence à digérer la portion précipitée, mais la digestion cesse rapidement et la majeure partie du caillot reste non dissoute.

Le lait tournesolé bleuit fortement les premiers jours après l'ensemencement, phénomène général pour toutes les bactéries voisines des bactéries charbonneuses.

Petit-lait tournesolé. — Le liquide bleuit progressivement et le tournesol commence à se décolorer. Les vieilles cultures présentent un liquide incolore avec un voile rose. Quand on brise le voile, le liquide devient rose.

Le *sérum coagulé* n'est pas digéré.

Le *blanc d'œuf coagulé* n'est pas digéré.

Le sang est hémolysé le troisième ou quatrième jour après l'ensemencement, il ne se forme pas d'Indol.

Le développement est très caractéristique sur la *pomme de terre*. Vingt-quatre heures après l'ensemencement, il se forme un voile d'un brun clair. Ce voile est recouvert de gouttelettes liquides, comme dans la culture sur la gélose. Ces gouttelettes se recouvrent d'une couche épaisse de bactéries et atteignent parfois des dimensions très considérables (jusqu'à 0,5-0,7 centimètres de diamètre). Ensuite les gouttelettes se dessèchent et donnent à la culture son aspect plissé caractéristique. Sur les cultures de sept à huit jours, il apparaît un voile blanchâtre farineux.

Le développement sur la *carotte* ressemble beaucoup à celui sur la pomme de terre, sauf qu'il ne s'y forme pas de pigment.

Sur l'*artichaut*, le développement est très abondant comme sur la carotte. Le sixième-neuvième jour, il se produit un très faible verdissement.

Action sur les sucres. — Il n'y a jamais de formation de gaz.

Le microbe fait fermenter le lévulose, le saccharose ; son action est plus faible sur le glucose, le maltose, la glycérine et la mannite. Le deuxième ou le troisième jour, le milieu se décoloré ; le quatrième-cinquième jour, il se produit un fort bleuisissement. Ce phénomène est particulièrement net en présence des sucres que le microbe ne digère pas (lactose, galactose).

Virulence. — Injecté dans la cavité générale du corps de *Galleria*, le microbe est très virulent ; il ne l'est pas pour les cobayes et les souris.

CULTURE N° 4 (fig. 6). — La quatrième culture semble être constituée par l'une des variétés du *Bacterium Subtilis*, auquel elle correspond par toutes ses propriétés, sauf en ce qui concerne son développement sur gélose et en bouillon.

La culture sur la gélose ressemble beaucoup par son aspect

extérieur à celle du *Bacterium Anthracoïdes* : c'est un voile épais, mou et blanc. Sur le bouillon, le microbe ne forme pas le voile solide si caractéristique du *Bacterium Subtilis*. Le voile est très fin et se déchire facilement. Nous proposons de nommer cette variété de *Bacterium Subtilis*, virulente pour les insectes, *Bacterium Subtilis*, var. *Galleriæ*.

En janvier 1926, j'ai étudié, en collaboration avec M. Metalnikov, une nouvelle épidémie, et nous avons réussi à obtenir des cultures pures des microbes qui l'avaient provoquée. Des ensemencements sur bouillon et sur gélose ont donné des cultures très abondantes constituées par deux microbes. Nous



FIG. 6. — Formation des spores de *Bacterium Subtilis* (variation *Galleriæ*).

avons séparé ces microbes par les méthodes usuelles, et nous avons obtenu deux cultures pures : une de bâtonnets et une de diplocoques, que je désigne sous les noms de *Bacterium Galleriæ* n° 2 et de *Diplococcus Galleriæ* (1).

Cette épidémie fut particulièrement intéressante, parce qu'elle fut provoquée par un petit insecte, *Dibrachys Bauchemannus Ratz.*, qui est parasite des chenilles d'un grand nombre d'insectes. En piquant les chenilles de Mite des Abeilles avec sa tarrière, le *Dibrachys* leur inoculait en même temps les microbes.

Il a suffi d'éliminer le *Dibrachys* de la culture de *Galleria Mellonella* pour arrêter l'épidémie.

Nous avons essayé de contaminer les chenilles de *Galleria per os* avec les microbes que nous venions d'isoler, en mélangeant l'émulsion de ce microbe à la cire dont se nourrit la *Galleria*. Nous avons obtenu une grande proportion de chenilles malades, avec une culture fraîchement obtenue sur des chenilles malades. La virulence de ces cultures est très instable, elle disparaît très vite après ensemencement en milieux artificiels.

(1) *C. R. de la Soc. de Biol.*, 95, 19 juin 1926, p. 199.

<i>B. Subtilis</i> var. <i>galleriae</i> .	<i>Streptococcus</i> <i>galleriae</i> .	<i>Bacterium</i> <i>galleriae</i> n° 3.	<i>Bacterium</i> <i>galleriae</i> n° 2.	<i>Bacterium</i> <i>galleriae</i> n° 1.	NOM DES MICROBES
+	-	+	+	-	MOBILITÉ
+	+	+	+	-	COLORATION par la méthode de Gram
-	-	+	+	-	FORMATION DES SPORES
					DIMENSION DES ÉLÉMENTS
					Long. : 1,7-3,7 μ ; larg. : 0,25-0,35 μ .
				+	AÉROBIOSE
					LIQ. ÉPACTION DE LA GÉLATINE
					COAGULATION DU LAIT
					LAIT TOURNESOLÉ
					PETIT LAIT TOURNESOLÉ
					SÉRUM COAGULÉ
					BLANC D'ŒUF
					FORMATION D'INDOL
					HÉMOLYSE DU SANG
					RÉDUCTION DES SULFATES

					FERMENTATION DU MALTOSÉ	FERMENTATION DU SACCHAROSÉ	FERMENTATION DU LACTOSÉ	FERMENTATION DE LA MANNITÉ	FERMENTATION DE LA GLYCÉRINE	FORMATION DE GAZ en milieu sucré	ROUGE-NEUVE	POMME DE TERRE	PIGMENTS	CAROTTE	ARTICHAUT	OBSERVATIONS	
+	+	+	+	-					+								Pathogène pour les insectes.
-	-	-	-	-					-								Très pathogène pour les souris, cobayes et les insectes.
+	+	-	(faible)	(faible)	-				-								Pathogène pour les insectes.
+	+	-		+	-				-								Pathogène pour les insectes.
-	-	(faible)	(faible)	-					-								Pathogène pour les insectes.

Les vieilles cultures mélangées à la nourriture ne peuvent pas contaminer les chenilles.

Pour établir le rapport qui existe entre la flore normale de l'intestin et l'apparition des maladies chez les *Galleria Mellonella*, j'ai été amené à étudier cette flore chez ces insectes.

Il est intéressant de signaler la pauvreté de cette flore chez *Galleria Mellonella*, comparativement à la flore intestinale des autres insectes, par exemple à celle de l'abeille étudiée par White (1), des moustiques, des poux, des punaises et d'*Euxoa segetum*, étudiée par Stutzer (2), etc.

La pauvreté de la flore intestinale de *Galleria* est en rapport avec le genre de nutrition de cet insecte.

En examinant au microscope les intestins de Mites des Abeilles, on n'observe jamais qu'un seul Streptocoque assez volumineux, qu'il nous a été facile d'identifier à celui que j'ai décrit précédemment, sous le nom de *Streptoccocus Galleriae* (3).

Par certaines de ses propriétés, ce microbe ressemble au *Diplococcus Melolenthæ*, isolé par A. Paillot (4).

En ensemencant stérilement le contenu de l'intestin sur gélose, j'ai obtenu souvent du premier coup une culture pure de ce microbe. Ayant examiné un grand nombre d'intestins, je n'en ai pas rencontré un seul où je n'aie trouvé le Streptocoque ; ce dernier semble être un saprophyte constant de *Galleria Mellonella*. Étant très peu virulent par lui-même, il pénètre toujours dans la cavité générale au moment où la *Galleria* est contaminée par d'autres microbes. J'ai étudié de nombreuses souches de ce microbe, quant à leur réaction aux graisses, et je n'ai jamais pu constater le plus faible dédoublement des graisses. Par rapport aux sucres, il est au contraire très actif ; il fait fermenter tous les sucres que j'ai essayés.

Il est possible qu'il existe un autre Streptocoque capable de dédoubler des graisses, et qui se rencontre avec les microbes que je signale, mais je n'ai jamais réussi à en obtenir de culture.

(1) N. S. Dep. Agr. Bull., 1920.

(2) Journ. de Microbiol. de l'Inst. Pasteur de Leningrad, 1926.

(3) C. R. de la Soc. de Biol., 95, 19 juin 1926, p. 199.

(4) PAILLOT. Thèse.

L'existence d'un tel streptocoque est confirmée par le travail de P. Manceau (1). Cet auteur ensemencait le contenu de l'intestin de Mite des Abeilles sur des milieux particuliers additionnés de miel et réussit à obtenir ainsi une culture pure de diplocoque capable de dédoubler les graisses.

En ensemencant le contenu de l'intestin du *Galleria Mellonella* sur gélose, j'ai souvent réussi à obtenir des colonies isolées de *Bacterium Galleriae* n° 2, de *Bacterium Subtilis* et une levure. Cette levure fut étudiée par nous en collaboration avec notre ami M. Ioumanoff et désignée sous le nom de *Mycoderma Galleriae* (2). Tous ces microbes et levures ne présentent pas la propriété de décomposer les graisses, bien que leur hôte se nourrisse aux dépens de la cire. L'existence, dans l'intestin de *Galleria*, de microbes capables de décomposer les graisses est néanmoins confirmée par les expériences de Seliber (3), qui a obtenu une culture de bacilles décomposant les graisses en ensemencant le contenu de l'intestin du *Galleria* sur un milieu additionné de cire provenant des bactéries tuberculeuses.

Dans le tableau ci-dessus, j'indique les propriétés essentielles des microbes isolés des chenilles de Mite des Abeilles, dont deux ont déjà été décrits antérieurement.

J'exprime ma profonde reconnaissance à mon maître, le professeur Metalnikov, qui m'a suggéré ce travail, et qui a eu la bienveillance de me conseiller et de me diriger.

(1) *Le Moniteur médical*, n° 44, 31 octobre 1922.

(2) *C. R. de la Soc. de Biol.*, 96, 28 janvier 1927, p. 151.

(3) *Bull. de l'Inst. Scientif. Lesshaft*, Petrograd, 5, 1922.

REVUE CRITIQUE

PRINCIPES DE MICROBIOLOGIE DU SOL

par S. WINOGRADSKY.

SELMAN A. WAKSMAN, *Principles of Soil Microbiology*, 880 p.,
Baltimore, U. S. A.

Un volumineux Traité de plus de 800 pages entièrement consacré à la *microbiologie du sol* est un phénomène nouveau dans notre science. Il est bien digne d'attirer l'attention, d'autant plus qu'il a pour auteur Waksman, le savant américain qui s'est distingué par de nombreux travaux dans ce domaine spécial.

Si l'on songe que les notions touchant à la microbiologie du sol figuraient dans les Traités généraux de microbiologie parus avant 1910 que par quelques chapitres (sur la *nitrification*, la *dénitrification*, la *fixation de l'azote*, etc.), on voit l'extension qu'elles ont prise depuis. C'est à partir de 1910 environ que ces notions commencent à se dégager de la *Microbiologie Générale*, pour faire partie d'une *Microbiologie Agricole* où l'on trouve réunis tous les faits microbiologiques intéressant l'agriculture ainsi que la viticulture, soit : la microbiologie de la *laiterie* et de la *fromagerie*, des *fourrages*, des *fumiers*, du *sol*, des *eaux*, des *industries agricoles*, etc. La place réservée au sol n'y est pourtant que restreinte. Ainsi dans le *Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie* de Löhnis, le premier de ce type et le plus volumineux, sur les 800 pages du volume, le sol n'en prend que 300, et encore le sujet y est-il traité plutôt d'un point de vue agronomique, de sorte que les faits microbiologiques n'y apparaissent qu'à l'arrière-plan.

On retrouve sensiblement le même programme dans tous les traités et manuels de *Bactériologie* (terme employé de préférence) ou de *Microbiologie Agricole* publiés après celui de Löhnis en langues française, anglaise, allemande, russe. L'ouvrage de Kayser, le seul français, qui a d'ailleurs le caractère d'un manuel succinct, n'en

diffère que par ce que la microbiologie appliquée à l'agriculture remplit un petit volume de 300 pages, tandis que les industries agricoles sont traitées dans un second volume plus important.

Ce programme apparaît justifié surtout par des buts d'enseignement, car il est évidemment dans l'intérêt des étudiants des écoles d'agriculture de trouver dans un seul ouvrage l'ensemble de toutes les connaissances de microbiologie qui peuvent leur être utiles; il l'est beaucoup moins au point de vue des recherches scientifiques dont l'orientation dépend de la méthode à appliquer au sujet, donc de la nature de ce dernier. Pour ne parler que de la laiterie, qui tient généralement le plus de place dans tous ces traités, il saute aux yeux que son étude n'a presque rien de commun avec l'étude du sol. Il s'agit là de deux milieux différents, on pourrait dire à tous les points de vue imaginables. On pourrait y prédire, même si on ne le savait pas, l'existence de microflores totalement différentes, exigeant chacune de son côté des procédés d'étude particuliers. Les observations dans les deux domaines ne s'enchaînent daucune façon, il est clair qu'un choix entre les deux devait s'imposer à tous les investigateurs. C'est ce qui eut lieu, en effet, dans le courant de la dernière douzaine d'années. La laiterie et le sol se sont séparés de plus en plus, possédant chacun leurs laboratoires, leurs spécialistes et même leurs Congrès particuliers. S'ils restent encore réunis dans quelques laboratoires, l'union ne paraît plus pouvoir durer longtemps.

Il va sans dire que les mêmes remarques se rapportent aussi à toutes les industries agricoles dont la place dans la microbiologie des fermentations ou des industries est tout indiquée.

Le sol est un milieu *sui generis* extrêmement complexe. Pour étudier le jeu si enchevêtré des forces microbiennes dont il est le siège, il est évidemment nécessaire de se tenir au courant des études physiques, chimiques, biologiques, sur le milieu *sol*, qui ont acquis actuellement un énorme développement. Une forte impulsion en est venue d'Amérique, et c'est de là, également, que vient l'idée de grouper toutes les études se rapportant au sol sous l'enseigne d'une *Science du Sol*. Le mouvement scientifique s'inspirant de cette idée a trouvé son expression, comme on le sait, dans la constitution d'une « Association internationale de la science du sol » ou « pédologie », dont le premier Congrès vient de tenir ses assises en juin à Washington. La microbiologie du sol y occupait la section 3.

On comprendra aisément que les microbiologistes intéressés n'ont pu faire autrement que de graviter vers ce nouveau centre, la *pédologie*, d'autant plus que le sol, étant la base même de l'agriculture, présente un champ d'études à peine ébauchées et, par consé-

quent, absorbant au maximum. Bref, une spécialisation est devenue inévitable. Un traité spécial en est la consécration définitive, et il faut savoir gré à M. Waksman d'avoir mené à bonne fin cette lourde tâche.

Avant d'en présenter l'analyse, restons sur le terrain de la théorie et considérons les principes de cette nouvelle science, et de sa méthode, *tels que nous les entendons*. Le caractère particulier du milieu paraît déjà justifier sa raison d'être, mais c'est surtout la méthode qui importe quand une discipline nouvelle est à constituer.

Les méthodes de la Microbiologie Générale sont-elles applicables sans adaptations ou corrections essentielles à la Microbiologie du sol? C'est là le point principal qu'il s'agit de discuter. Elles sont dominées, comme on le sait, par un principe immuable : celui de la *culture pure*. Un second principe exige de faire passer la culture pure par une série de milieux conventionnels pour étudier les réactions de l'espèce microbienne dont on tire sa caractéristique physiologique. Ajoutons que les cultures pures sont considérées comme identiques aux espèces *sauvages* dont elles proviennent, et que ce sont ces cultures de collection, isolées et réensemencées depuis un temps indéfini, qui servent généralement, pour ne pas dire universellement, aux expériences.

Ces trois points nous suffiront pour caractériser le procédé de la Microbiologie Générale. Autant qu'il s'agit de la morphologie et de la physiologie des microbes, il n'y a qu'à se louer des brillants résultats qu'il a donnés. Pour étudier *tous* les caractères d'une espèce, y compris ses propriétés potentielles ou latentes, la culture pure est évidemment le seul moyen, et le fait même qu'elle conduit, sous certaines influences, à des variétés ou races nouvelles, a été souvent considéré comme un avantage précieux de la méthode.

Tout autre est le cas de la Microbiologie du sol, dont la tâche est de démêler les activités microbiennes *telles qu'elles se présentent dans leur cadre naturel* qu'il ne nous est pas possible de modifier d'une manière bien profonde. Le point de départ est donc tout différent, et l'on conçoit aisément que ce ne sont pas les méthodes de la Microbiologie Générale qui pourront conduire à la connaissance des fonctions microbiennes *dans la nature*. On aurait même toute raison de craindre qu'on n'en puisse avoir une idée adéquate en opérant d'après ses procédés, qui pourraient faire subir aux microbes du sol des modifications plus ou moins profondes sous l'effet des artifices de laboratoire dont l'arsenal est presque illimité. L'expérimentation se heurte donc ici à des restrictions qu'elle ne devrait pas enfreindre, au risque de perdre contact avec le phénomène naturel. Un esprit œcologique, nécessaire dans ce cas au même titre que dans les

études botaniques ou zoologiques, la conduira à dégager, autant que possible, le jeu des forces naturelles des effets de l'ingérence humaine. Rien de plus clair, pour autant qu'il s'agisse des êtres supérieurs : il paraîtrait absurde de chercher la flore d'un pays dans les serres, jardins ou champs cultivés, ou la faune dans les fermes ou basses-cours. La même erreur ne nous frappe pas autant quand il s'agit de microbes, et pourtant ces derniers sont beaucoup plus à la merci de l'expérimentateur dans les serres à microbes que les plantes supérieures dans les serres de l'horticulteur.

Il y a donc dans la Microbiologie du sol une idée directrice nouvelle, qui doit forcément conduire à une méthode propre, et on voit tout de suite ce qui la distingue des méthodes de la Microbiologie Générale. Tandis que celles-ci ont pour règle d'opérer avec des cultures pures, qu'elles font passer par des milieux à formules diverses organiques, l'autre n'est censée se servir que du *milieu naturel*, ou au moins d'un milieu reproduisant aussi fidèlement que possible ses caractères; et ce qu'elle devrait éviter le plus strictement, c'est justement la culture pure qui est, de toutes les conditions, la plus artificielle, non seulement à cause des influences réciproques des différents microbes qu'elle écarte, mais surtout pour la raison que cette condition donne à l'expérimentateur tous les moyens de forcer la nature de l'organisme, de le plier à des modes d'existence qui ne sont pas normaux dans le milieu naturel, en exploitant, en même temps que ses propriétés actuelles, toutes les propriétés potentielles ou latentes que le microbe n'aurait eu peut-être jamais l'occasion de développer sans son ingérence. La Microbiologie du sol ayant précisément ces propriétés actuelles ou réelles pour sujet d'études, il lui est foncièrement impossible de faire abstraction des conditions biologiques qui règnent dans le sol en adoptant le principe de la culture pure. Par son essence même, cette microbiologie est celle des mélanges, des collaborations, des antagonismes ou luttes microbiennes pour la substance énergétique. On ne peut suivre rien de tout cela en culture pure, ce qui est évident, et pourtant ce ne sont que ces luttes qui déterminent la répartition et la subsistance des fonctions microbiennes et qui règlent les activités dans le temps et l'espace.

Pour rendre ce raisonnement plus concret, appliquons-le en passant en revue quelques groupes des plus caractéristiques des microbes du sol.

Commençons par les *fixateurs d'azote*. On sait que deux petits groupes en ont été découverts dans le sol, l'un aérobie (Wino-gradsky, 1896), l'autre aérobie (Bijerinck, 1903). Dans la suite on

s'est toujours heurté à l'un ou à l'autre toutes les fois qu'on enseignait le liquide électif avec de la terre. Ce fait paraissait justifier l'opinion de Winogradsky, émise il y a déjà une trentaine d'années, que la faculté de fixer l'azote est *spécifique* et qu'elle n'est propre dans la nature qu'au seul groupe alors connu, auquel est venu se joindre plus tard le groupe aérobiose. Mais voilà qu'on se met à éprouver un nombre de cultures pures de microbes d'origines diverses n'ayant pas même le sol comme habitat, y compris plusieurs espèces pathogènes, et on constate que, dans le cas où le microbe supporte l'inanition azotée sans périr rapidement, quelque gain d'azote en résulte. De là la conclusion que l'opinion citée serait erronée et que la fonction serait largement répandue dans le monde des microbes. Cette conclusion paraît assez universellement admise et comme définitivement établie. Pourtant, quand celui qui écrit ces lignes a repris la question de la répartition des microbes fixateurs dans le sol, au moyen d'une méthode plus directe et beaucoup plus sensible que l'ancienne, il n'a jamais trouvé, en fait de fixateurs, dans les nombreux échantillons de terres de provenances très diverses et dans des expériences qui ont duré plusieurs années, que les deux petits groupes ci-dessus nommés. Ce résultat, si franchement négatif, ne conduit-il pas à la conclusion que ce ne sont que ces deux groupes classiques qui sont les *fixateurs naturels*, tandis que tous les autres ne sont que des *fixateurs artificiels*, ou de laboratoire, c'est-à-dire des êtres qui n'exercent pas cette fonction normalement, mais chez lesquels elle peut être développée jusqu'à un degré, assez faible du reste, par des moyens appropriés. La Microbiologie du sol gardera les premiers et laissera le reste à la Microbiologie Générale.

Un autre groupe important est celui des *autotrophes*, dont les microbes de la *nitritation* et de la *nitratation* sont les représentants les plus connus, et qui comprend les groupes oxydant le soufre métalloïdique, les sulfures et thiosulfates, l'oxyde ferreux; enfin ceux qui brûlent les gaz hydrogène et formène. Le type physiologique établi depuis plus de trente-cinq ans (Winogradsky, 1891) s'est retrouvé immuable dans tous les groupes étudiés plus tard. Mais on n'a pas manqué d'essayer leur culture pure sur les milieux organiques conventionnels, et il apparut qu'il y en a qui se montrent absolument réfractaires à ce genre d'existence, tandis que d'autres pourraient être entraînés à pulluler sur ces milieux. De là on conclut que la majorité des organismes de ce type ne seraient que des *autotrophes* ou des *hétérotrophes facultatifs*, sorte d'organismes à double face ou types, et passant aisément de l'un à l'autre. Or, si

l'on se donne la peine d'analyser les effets des luttes microbiennes dans le sol, on voit tout de suite l'avantage de pouvoir y pulluler aux dépens d'une substance énergétique inorganique, donc indépendamment de la substance organique qui attire tant de compétitions ; et on sera tout disposé à admettre que *les autotrophes ne sont que des autotrophes dans la nature*, et que leur hétérotrophie, du reste bien imparfaitement démontrée dans plusieurs cas, n'est qu'artificielle. Si ceci n'est pas encore démontré, la conclusion contraire ne l'est pas davantage, et de ces deux conclusions, c'est la première qui se présente comme la plus vraisemblable et la plus apte à orienter les recherches.

En passant de ces organismes spécifiques, dont l'originalité même ne laisse pas de doutes sur leur fonction dans le milieu naturel, aux processus de décomposition des matières organiques, on entre en plein chaos. Le nombre des espèces qui y prennent part est si grand, et leurs *sphères d'action* si enchevêtrées, qu'il est bien difficile de décider de la fonction de tel ou tel autre organisme, ou groupe, dans le milieu *sol*. Le fait qu'il est souvent isolable de celui-ci ne nous dit rien sur son activité dans ce milieu qui est le dépotoir de tous les déchets, et où certains germes très résistants peuvent se conserver presque indéfiniment. Une question se pose donc devant la Microbiologie du sol, savoir : de toute cette foule de microbes à fonctions mal délimitées que nous a fait connaître la Microbiologie Générale, quels sont ceux qui doivent être considérés comme les agents actifs du sol ? Le temps n'est, certes, pas encore venu de discuter cette question à fond, mais il paraît déjà possible d'indiquer les lignes générales qu'il faudrait suivre pour y arriver. C'est la conception de la lutte pour la matière énergétique qui nous guidera de nouveau dans ce cas.

Supposons l'une de ces matières incorporée à un sol normal, milieu minéral qui en manque le plus souvent, car elle en disparaît très rapidement. Les conditions de température et d'humidité le permettant, l'attaque est immédiate, et la décomposition ne prend souvent que quelques heures. N'est-il pas évident que la substance deviendra la proie de l'espèce (ou du petit groupe le plus adapté à déclencher le processus dans les conditions données) qui pullulera à l'exclusion des autres, lesquelles n'auront guère le temps de développer leurs moyens d'action. Les observations d'après la *méthode des cultures spontanées* confirment pleinement cette manière de voir (Winogradsky, ces Annales). Si c'est ainsi, on voit le chemin à suivre qui est la recherche de la spécificité dans l'action ou, au moins, de l'adaptation aux conditions données. Plus étroite sera la spécialisation ou l'adap-

tation, et plus un microbe aura la chance de prévaloir sur ses concurrents moins spécialisés, ou n'arrivant à déclencher le processus qu'en présence d'aliments supplémentaires, ou encore protégés par la culture pure. Un exemple des plus instructifs touchant à la décomposition de la cellulose nous permettra d'expliquer ce principe sans longs développements.

On sait que la question de la décomposition de la cellulose dans le sol par les bactéries, phénomène d'importance majeure, est restée longtemps ouverte. Jusqu'à 1912, les bacilles anaérobies d'Oméliansky étaient les seuls connus, ferment bien spécifiques, mais dont les lieux d'action sont plutôt les fumiers et les marais que le sol. Des recherches très étendues ont été entreprises sur ce sujet par Kellermann et collaborateurs (1912-1914) qui isolèrent du sol jusqu'à 36 espèces qu'ils croyaient nouvelles, en employant un milieu à base de gélose contenant de la cellulose précipitée de ses solutions dans la liqueur cuprique ou dans l'acide sulfurique ; notamment des bâtonnets minuscules, peu caractéristiques, non spécifiques dans leur action, car ils s'accordaient bien de divers sures, de l'amidon et en général des milieux bactériologiques. En reprochant à Oméliansky la pureté incomplète de ces cultures, les auteurs américains ont pris tous les soins pour avoir les leurs irréprochablement pures. Malheureusement, leur pouvoir de décomposer la cellulose y apparaissait si faible qu'il était bien permis d'émettre des doutes sur sa réalité. Et quant au milieu *sol*, où la cellulose se dépose, au surplus, à l'état organisé plus difficilement attaquable, et dont l'attaque exige sûrement des adaptations spéciales, il n'y avait aucune raison de l'admettre. Ces recherches n'ont donc fait qu'enrichir la liste des cultures pures, sans permettre de faire avancer d'un pas la question posée.

Un progrès décisif a pu être obtenu seulement en 1916, quand Hutchinson et Clayton, en procédant avec plus de critique, ont réussi à découvrir dans le sol de Rothamsted un microbe très caractéristique dénommé *Spirochæte Cytophaga*, dont l'action s'est révélée strictement spécifique ; il ne pullule qu'aux dépens de la cellulose en la décomposant sous la forme naturelle, au point que les sures réducteurs, meilleurs aliments pour les microbes banaux, non seulement ne sont pas utilisables, mais entravent son développement, tout comme dans le cas des microbes nitrificateurs. La découverte est restée isolée durant une dizaine d'années, jusqu'à ce qu'un nouveau mode opératoire (Winogradsky 1924) ait permis de retrouver ces *Cytophaga*, accompagnés ou remplacés par des vibrions possédant également une action fibrolytique énergique, dans tous les sols. Cette

fois la question était bien résolue, et même sans qu'une purification complète des cultures, si difficilement réalisable quand il s'agit d'organismes spécifiques, soit obtenue.

En l'état où se trouve la Microbiologie du sol, il serait difficile de trouver un exemple aussi instructif que celui que nous venons de mentionner. Cependant un autre cas, concernant la décomposition de l'urée, se dégage assez nettement des observations accumulées sur ce sujet dans la Microbiologie Générale. On sait que le nombre des bactéries capables de décomposer l'urée est considérable, mais que la majorité ne le fait qu'en présence d'autres corps fermentescibles, sucres ou peptones, de préférence. Il existe pourtant quelques espèces qui se contentent de l'urée comme seul aliment énergétique et plastique (Söhngen, 1909), et ce sont évidemment celles-là qui se recommandent comme agents actifs du sol, ce milieu ne pouvant offrir des sucres et peptones qu'il ne possède que par exception extrêmement rare et bien passagère.

Si l'on admet que la Microbiologie Générale ne s'est jamais inspirée des principes que nous venons de mettre en relief, il est clair que toutes ses données ne sauraient être appliquées à la microbiologie du sol, sans études spéciales. Il est même aisément de prévoir que plusieurs de ces données ne trouveraient aucune application. Ceci est d'autant plus probable que plusieurs processus attribués aux microbes du sol ont été étudiés dans les milieux liquides, qui favorisent tant les phénomènes de réduction. Il y a, par exemple, lieu de se demander si certains processus liés à la présence de nitrates dans la solution, comme la dénitrification, la décomposition anaérobiose de la cellulose, l'oxydation anaérobiose du soufre et des sulfures, pourraient jamais marcher dans le sol qui ne contient que des traces de nitrates, toujours rapidement assimilées par les organismes, autrement que comme une exception très rare. Si l'on songe, au surplus, que les solutions contenaient, en même temps que de grosses doses de matières fermentescibles, jusqu'à plusieurs unités pour cent de nitrate, on voit tout ce que ces expériences avaient d'artificiel.

On ne saurait passer sous silence un sujet d'études très suivies en Microbiologie Générale, et qui doit être mis à l'index tant qu'il s'agit du milieu sol. Nous entendons les expériences de *numération des germes*. La question du *nombre* est certainement importante, le nombre étant la mesure de la pullulation des germes et, sous certaine réserve, de leur action. Le malheur est que cette numération est faite par la méthode courante des plaques. On connaît bien les défauts de cette méthode, dont le principal est qu'un grand nombre de microbes sont réfractaires à ce genre de culture; on continue

néanmoins de parler, par habitude, de *nombres totaux (total numbers)*. Tant que les *vrais totaux* étaient inconnus, l'équivoque n'attirait pas trop l'attention ; mais depuis qu'il est devenu possible de les établir par examen microscopique direct (Conn, 1918 ; Winogradsky, 1924), la méthode paraît mériter un discrédit complet. En effet les *totaux vrais* dépassent les chiffres des numérations sur plaques, des dizaines et des centaines de fois ; autrement dit, les nombres que l'on y trouve ne sont qu'une petite fraction des germes du sol, fraction qui n'est probablement active que par intermittence.

Changer une méthode dont on a pris l'habitude n'est jamais agréable ; aussi a-t-on reproché à la numération directe d'être trop imparfaite en comparaison de l'ancienne méthode. Ceci est vrai en ce sens qu'elle n'est qu'approximative, et pourtant, en dépit de ce défaut, l'examen microscopique direct donne une idée infiniment plus exacte de la densité de la population microbienne, que la méthode soi-disant précise des *plaques*.

Nous avons déjà eu l'occasion d'exposer antérieurement toutes ces considérations. La publication d'un premier *Traité de microbiologie du sol* nous incite à les développer avec plus d'ampleur pour prendre position dans cette branche de la science qui est en train de se constituer.

Rappelons que ces raisonnements ne sont pas restés dans le domaine de la théorie pure ou de la critique, mais qu'ils ont conduit à l'élaboration d'une méthode spéciale désignée sous le nom de *méthode directe* ; et que cette méthode a déjà subi une épreuve sérieuse, ayant été appliquée, à l'exclusion de toute autre, à un groupe important de microbes du sol (1).

L'ouvrage de Waksman présente un tableau très complet de l'état actuel de la Microbiologie du sol, ou plutôt des notions que l'on réunit assez généralement sous cette enseigne.

Il se compose de trois parties, dont la première résume les données sur la présence, la différenciation, l'isolement, l'identification et la culture des microbes ; la seconde, sur leurs activités chimiques ; la troisième, sur les processus microbiens du sol et sur leurs relations avec la fertilité.

(1) WINOGRADSKY. Ces *Annales*, 1925-1926. Voir aussi : « The direct method and its application to the study of nitrogen fixation ». Congrès International de Pédologie, Washington. — En collaboration avec Mme Ziemecka : « A rapid method of controlling the activity of Azotobacters in soils ». Même Congrès.

La première partie réunit toutes les notions produites par les recherches de Microbiologie Générale se rapportant aux microbes *isolés du sol*. On y trouve la description des méthodes classiques de cette microbiologie, et les caractères de tous les groupes de bactéries dont on a constaté la présence dans le sol, à savoir : les bactéries autotrophes, les fixateurs d'azote, symbiotiques et non symbiotiques, les bactéries hétérotrophes aérobies, les mêmes anaérobies, les bactéries réduisant les nitrates et les sulfates, les bactéries détruisant la cellulose ; enfin celles qui décomposent l'urée, les acides urique et hippurique. Des chapitres à part sont consacrés aux algues du sol, aux champignons, aux actinomycètes, aux protozoaires. Pour être plus complet, l'auteur a cru devoir ajouter encore un autre chapitre qui résume brièvement les notions acquises sur la *faune non protozoaire* du sol, les *vers*, les *arachnides, myriapodes, insectes, mollusques*.

Notons que l'auteur suit très fidèlement les lignes de la Microbiologie Générale, sans préconiser ni prévoir aucun point de vue spécial à la Microbiologie du sol. C'est dire que son exposé est sujet aux critiques que nous venons de développer ; elles nous ont conduit à la conclusion que ces données ne reflètent que très imparfaitement les phénomènes microbiens qui ont lieu dans la nature ; l'idée sommaire qu'elles nous en donnent peut suffire à la rigueur, pour autant qu'il s'agit de notions microbiologiques générales ; mais ces notions apparaissent bien insuffisantes quand il s'agit de les prendre pour base d'une Microbiologie spéciale au milieu naturel. Il n'est que trop évident que l'étude des espèces isolées, fussent-elles même les plus importantes ou intéressantes, ne peut fournir que des renseignements fragmentaires et bien imprécis sur la composition de la population microbienne du sol, sur sa densité absolue, sur les densités relatives des espèces qui la composent, sur leur état d'activité ou de repos, sur les conditions qui président à ces états et qui règlent les activités microbiennes dans le sol, et aussi sur bien d'autres questions dont l'étude ne pourrait avancer d'un pas au moyen des méthodes courantes de la Microbiologie Générale. Cette appréciation se dégage particulièrement nette à la lecture des chapitres correspondants de l'ouvrage, à cause des mérites mêmes de l'exposé de l'auteur, lequel n'a pu, évidemment, faire plus que de tirer le meilleur parti du stock des connaissances acquises.

La seconde partie est la partie chimique du traité. Elle y tient une large place. Les chapitres sur *les principes généraux du métabolisme microbien* et sur *les transformations d'énergie dans ce métabolisme*, lui servent d'introduction. Le chapitre sur la *décomposition de la matière organique non azotée* s'occupe surtout, comme de juste, de la décom-

position de la cellulose ; dans celui sur la décomposition de la matière azotée c'est la libération de l'ommoniaque, phénomène capital dans le sol, qui retient le plus l'attention. La question de l'équilibre biochimique du sol, tendant à maintenir le rapport Az à C à peu près constant, est traitée dans le chapitre suivant. Enfin, les quatre derniers chapitres sont consacrés à la nitrification, à la réduction des nitrates, à la fixation de l'azote, à la transformation du soufre.

On retrouve donc, dans la partie chimique, les questions qui ont été déjà traitées dans la première partie, du point de vue bactériologique. Ce plan peut être justifié par les points de vue différents, les différentes méthodes et sources d'information, mais il a le défaut de troubler l'unité de l'exposition et de rendre les redites presque inévitables.

La troisième partie résume toutes les applications des données microbiologiques et biochimiques à l'étude du sol comme milieu de culture et de sa fertilité. C'est la partie agronomique du Traité.

Elle commence par les caractères du sol comme milieu de culture : ses qualités physiques, sa composition minérale, sa substance organique, ses colloïdes, sa dissolution saline, son atmosphère, son pH, etc.

Passant aux activités des microbes dans ce milieu, un chapitre est consacré à la transformation des substances minérales du sol ; un autre aux caractères généraux aisément contrôlables de la transformation de la matière organique qui sont : 1^o le dégagement de l'acide carbonique, ou la respiration du sol; 2^o la production d'ammoniaque et de nitrates aux dépens des corps azotés ; 3^o la formation d'un résidu résistant à la décomposition, désigné sous le nom de matière humique.

L'état de nos connaissances sur ce dernier processus et sur la nature chimique de l'humus est développé avec beaucoup d'ampleur.

Les chapitres sur l'analyse microbiologique du sol comme index de sa fertilité et sur l'équilibre microbiologique du sol, touchent à des thèmes qui ont provoqué le plus d'efforts du côté des biochimistes et des chimistes agronomes. Il s'agit là de toute une série de recherches inspirées par les mêmes méthodes. L'auteur lui-même y a pris une large part. Il n'est donc pas sans intérêt de les examiner de plus près, d'autant plus que le moment paraît venu d'en tracer le bilan définitif.

Mettre en rapport les différents processus microbiens entre eux d'une part, étudier leur répercussion sur la fertilité d'autre part, tels en étaient l'idée dominante et le but. Il y avait quelque raison de croire que les phénomènes microbiens mesurables, — la respiration du sol, le nombre de ses germes, ses capacités d'ammonification, de

nitrification, de fixation, de décomposition de la cellulose, — fourniraient des caractères plus précis pour juger des propriétés du sol, de sa fertilité, que les méthodes physiques et chimiques courantes, et c'est cette promesse surtout qui a attiré de nombreuses recherches dans cette direction pendant une vingtaine d'années. On prenait pour objet d'étude les terres des parcelles des champs d'expérience, qu'on soumettait à des *épreuves microbiologiques* au moyen de deux méthodes différentes. Tantôt on en jetait quelques grammes, et jusqu'à dix pour cent, dans des quantités (50 à 100 cent. cubes) de liquides appropriés, de composition favorable au processus qu'on désirait provoquer : c'est la *méthode* dite des *solutions*. Tantôt on employait de la terre telle quelle, en lui incorporant de la matière hydrocarbonée ou azotée, et en la gardant en portions d'une centaine ou de plusieurs centaines de grammes, dans les meilleures conditions de température et d'humidité. Dans les deux cas, le milieu était soumis à des examens ou dosages répétés, pour suivre la marche des différents processus et pour déterminer leur résultat final. En comparant les données obtenues sur des parcelles voisines différemment traitées, avec les récoltes qu'elles donnaient, on jugeait de la valeur des épreuves microbiologiques comme index de la fertilité.

Ces expériences ont, certes, conduit à quelques observations dignes d'être notées. Elles ont quelquefois, notamment dans les expériences de Waksman lui-même, fait ressortir quelques coïncidences intéressantes entre la fertilité (déterminée par la récolte) et la respiration, ou le nombre des germes, etc. Mais la complexité des conditions physico-chimiques et biologiques était telle que ces épreuves n'ont pu conduire à des résultats suffisamment concordants pour entraîner la conviction.

Ce que l'on peut affirmer, c'est que l'intérêt de ces expériences au point de vue du développement de la Microbiologie du sol est nul. On ne se souciait pas des formes microbiennes qui pullulaient dans les fioles ou dans la terre, et on ne les soumettait à aucun genre d'étude. Le terme même employé par Waksman dans une suite de mémoires, et finalement dans son traité, à savoir *l'analyse microbiologique du sol*, ne donne lieu qu'à une équivoque, car il fait penser tout naturellement à des recherches sur la microflore, avec identification des espèces qui la composent, ce qui n'est aucunement le cas. L'expression *analyse biochimique* nous paraît préférable, étant plus conforme aux recherches dont il s'agit.

Quant à leur intérêt agronomique, ces études n'ont fait que confirmer ce qu'on savait sur les processus microbiens dominants et sur leurs rapports plus ou moins embrouillés avec la fertilité. Mais elles

n'ont conduit à aucune épreuve simple et pratique, apte à devenir d'un emploi courant en Agronomie. A ce point de vue, qu'on visait tout particulièrement, le résultat général de ces recherches paraît malheureusement bien insignifiant, et n'a pas manqué de causer un désappointement assez général. La raison en est à chercher, à notre avis, dans l'état peu avancé de nos connaissances sur le jeu des actions microbiennes dans le sol.

Des chapitres sur *le sol comme habitat de microbes pathogènes*, sur *l'inoculation de sol (soil inoculation)*, enfin un court aperçu historique de *l'évolution de la microbiologie du sol*, terminent le livre.

Ajoutons qu'il présente une bibliographie très complète du sujet, comprenant plus de 2.500 citations de travaux anglais, français, allemands, et russes.

En résumé, il n'y a qu'à se réjouir de ce que le savant américain ne s'est pas laissé décourager par une tâche quelque peu ingrate en l'état actuel de nos connaissances, en composant un livre qui rendra de grands services à tous les travailleurs de la *science du sol*.

Le Gérant : G. MASSON.